

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Mônia Sartor

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA INSULINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO  
TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO**

Porto Alegre

2018

Mônia Sartor

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA INSULINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO  
TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Área de habilitação: Bioquímica

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Gisele Hansel

Coorientador: Prof. Dr. Luis Valmor Cruz Portela

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Sartor, Mônia  
EFEITOS NEUROPROTETORES DA INSULINA EM ANIMAIS  
SUBMETIDOS AO TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO / Mônia  
Sartor. -- 2018.  
86 f.  
Orientadora: Gisele Hansel.

Coorientadora: Luis Valmor Cruz Portela.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto  
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. TCE. 2. Hiperglicemia. 3. Insulina. 4. Memória  
de reconhecimento. I. Hansel, Gisele, orient. II.  
Cruz Portela, Luis Valmor, coorient. III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Roska e Gisele por me apresentarem à vida científica e serem meus pais na ciência - e, modéstia à parte, eu tive ótimos pais! Obrigada pelos ensinamentos, pela paciência que tiveram com minhas inseguranças, pelas experiências compartilhadas e, acima de tudo, pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Neurotrauma, Afonso, Marcelo, Wanda, Nathan e Randall, por serem peças fundamentais para a realização desse trabalho, bem como para minha vivência científica. Agradeço por serem tão pacientes comigo, pela parceria profissional, pessoal e de mesa de “Bar i bar”. Por me apresentarem Porto Alegre e tornar a vivência aqui mais feliz e significativa. “Eu tenho pra mim que” vocês foram essenciais! SFDER! Aqui estendo meus agradecimentos a Thalia, amiga e parceira, a qual sou grata por todos os momentos de felicidade, pelas histórias e alegrias vivenciadas.

Às gurias do 26, Cati, Amanda, Dani, Prof<sup>a</sup> Lisiane e o Marcus, pelo companheirismo diário, pelo café de todas as manhãs, equipamentos compartilhados e pelos momentos de descontração nos “Imperial” da vida.

Aos meus colegas de graduação e futuros biomédicos Alexandre, Franciele, Letícia, Eloisa, Gabriela, Lucas, Martina, Gabriel, Giovana, Raul e Maia, pela amizade e companheirismo durante toda a graduação. Pelos trabalhos e relatórios realizados em parceria, pelos momentos de lazer e estudo no bar do Antônio e da arquitetura. Pude aprender muito com cada um. Obrigada infinito... Com vocês a caminhada tornou-se mais leve e feliz.

Cristina e Luiza. Obrigada pela amizade e pela positividade de sempre. Vocês são minhas preciosidades! Quero vocês sempre comigo.

Aos meus avós, Valdemiro, Umbelina, Maria Darós pelas orações de proteção, pelo amor de sempre e pelos “trocadinhos pro lanche” e “pro ônibus”. Obrigada por torcerem sempre pelas minhas conquistas. E ao vô Benvindo, que lá do céu, sei que intercede por mim, todos os dias. Vocês são meus exemplos!

Tia Dani, tio Altanir, Gustavo, Gabriel... obrigada por me apoiarem, vibrarem comigo, e pela alegria e amor que recebi todas as vezes que fui até vocês.

Lucas, meu bem. Obrigada, obrigada, obrigada... por seu meu melhor amigo, apoiador e encorajador. Por sonhar comigo e ajudar a tornar meus sonhos realidade. Pela paciência e sabedoria que tu teve - e tens - em me ouvir e me acalmar nos momentos de desespero (que foram muitos) e, mesmo por telefone, conseguias me confortar. Tu fostes essencial.

Jonas, amor da mana. Obrigada por entender meu distanciamento nesses anos e por me ajudar e apoiar no caminho dessa graduação. Te ter comigo me faz ser mais forte e me dá ânimo pra seguir.

Por último, e mais importante, aos meus pais, Jair e Eliza, à quem dedico esse trabalho. Pelo amor, paciência e apoio incondicional. Por serem os maiores incentivadores e estarem presentes, de corpo e de alma em todas as minhas conquistas. Vocês são meus orgulhos e tudo isso é por vocês e para vocês!

A todos, meu amor e minha eterna gratidão.

[...] E ali logo em frente a esperar pela  
gente o futuro está

E o futuro é uma astronave  
Que tentamos pilotar  
Não tem tempo nem piedade  
Nem tem hora de chegar  
Sem pedir licença muda nossa vida  
E depois convida a rir ou chorar [...]

Vinícius de Moraes

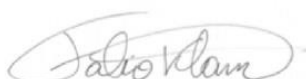
Mônia Sartor

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA INSULINA EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO  
TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 21 de dezembro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Fábio Klamt- UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil



---

Dr<sup>a</sup>. Clarissa Branco Haas - Universidade de Columbia, Cidade de Nova Iorque-NY, EUA



---

Dr<sup>a</sup>. Gisele Hansel–Universidade da Pensilvânia, Filadélfia-PA, EUA (orientador)

## RESUMO

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é definido por uma alteração na função normal do cérebro, causada por forças externas. Após o TCE, ocorre ativação de diferentes cascatas de eventos neurotóxicos que culminam com neurodegeneração e disfunções cognitivas. À nível sistêmico, a ocorrência de hiperglicemia é o efeito mais comum pós-TCE e está fortemente associada com o aumento da mortalidade e piora no prognóstico clínico. Dessa forma, a hiperglicemia atua como um facilitador dos mecanismos de dano secundário. A administração de insulina periférica, em casos de hiperglicemia pós-TCE, mostra-se benéfica na recuperação e melhora cognitiva do paciente. Atualmente tem se demonstrado que a insulina é capaz de se ligar aos seus receptores, em células neuronais, e exercer efeitos neuroprotetores, que, conceitualmente, poderiam melhorar a sobrevivência celular pós-TCE. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento com insulina em modelo animal de TCE por análises *in vivo* e *ex vivo*. Quanto às análises *in vivo*, utilizamos modelos animais de hiperglicemia induzida por fármaco (streptozotocina), e após, os animais foram submetidos ao tratamento com insulina ou salina, com posterior indução do TCE, pela técnica de Impacto Cortical Controlado (ICC). Observamos que a hiperglicemia promove aumento da mortalidade no TCE e déficit na memória de reconhecimento, efeitos que foram prevenidos com o tratamento com insulina. A literatura é consistente na associação entre o aumento da mortalidade em casos de hiperglicemia no TCE, além de se observar maior taxa de mortalidade em pacientes diabéticos insulino-dependentes, que sofrem trauma, em relação aos insulino independentes. Estudos mostram que a insulina apresenta efeitos positivos na cognição e sua sinalização é importante para formação e manutenção das memórias, premissas que podem explicar o efeito positivo da insulina na prevenção do déficit na memória de reconhecimento. Dessa forma, para avaliarmos os efeitos agudos desse hormônio, pós-TCE, realizamos ensaio *ex vivo* para visualizar a resposta das células frente à suplementação com insulina e isolar os efeitos desse hormônio a nível de Sistema Nervoso Central (SNC). Fatias hipocâmpais foram expostas à meios com concentração normal e alta de glicose, e suplementadas com insulina. Observamos aumento na razão do imunoconteúdo de pIRS-1<sup>Ser612</sup>/IRS-1, na presença do hormônio, somente no grupo sham, indicando responsividade das células hipocâmpais à adição de insulina neste grupo, contrário ao observado no grupo TCE, fato que pode estar associado à resistência cerebral a insulina no TCE. Há disfunção mitocondrial pós-TCE evidenciado pela redução do consumo de oxigênio no grupo TCE em relação ao sham, quando as mitocôndrias são desafiadas com substratos e inibidores da cadeia de transporte de elétrons. Esses efeitos não estão associados à um aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adição de insulina não apresentou efeitos benéficos significativos. Embora haja disfunção mitocondrial e sabe-se que esse efeito pode estar associada a perda de funcionalidade e mortalidade neuronal, esse estudo não evidenciou alterações na viabilidade celular. Em face aos nossos resultados, concluímos que há efeito sinérgico da hiperglicemia e o TCE no aumento da mortalidade e déficit na memória de reconhecimento, efeitos prevenidos pelo tratamento com insulina. Agudamente, verificamos que o consumo mitocondrial de oxigênio basal e a viabilidade celular não são alterados após o TCE. Porém evidencia-se a presença de déficit mitocondrial no hipocampo 24 h após o TCE, dado pela redução do consumo de oxigênio em resposta à adição de ADP em condições saturantes, quando comparado ao grupo sham; a presença de insulina anulou essas diferenças. Dessa forma, ressalta-se a importância da insulina na manutenção das funções metabólicas e de memória no TCE.

Palavras-chave: TCE. Hiperglicemia. Insulina. Memória de reconhecimento.



## ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) occurs when an external force or object penetrates and damage the brain tissue. After a TBI event, there is an activation of several cascades of neurotoxic events that lead to neurodegeneration and cognitive dysfunctions. Hyperglycemia is the most common post-TBI effect, and it is strongly associated with the increase in mortality and worse clinical prognosis. Also, hyperglycemia facilitates the secondary damage mechanisms post-TBI. Administration of peripheral insulin in TBI patients with hyperglycemia is beneficial to improve the clinical prognosis and cognition. It has been shown that insulin can be able to bind its receptors on neuronal cells and perform neuroprotective effects improvising post-TBI cell survival. The objective of this study was to evaluate the impact of insulin treatment in an animal TBI model, using *in vivo* and *ex vivo* experiments. In *in vivo* experiments, first, the animals were submitted to a model of hyperglycemia, induced by Streptozotocin. After that, the animals received treatment with insulin or saline, and then they were submitted to a TBI model. We observed that hyperglycemia increased the mortality and also cause a deficit of recognition memory in TBI animals. These effects were prevented by insulin treatment. Several studies have been associated with the increased of mortality in hyperglycemic patients that suffer TBI, and also higher mortality rate in insulin-dependent diabetic patients, who suffer trauma comparing to independent insulin diabetic patients. Studies have shown that insulin has positive effects on cognition and its signaling is important for the formation and support of memories, premises that may explain the positive effect of insulin in the prevention of recognition memory deficit. Thus, to isolate brain effects and also to evaluate the effects of both hyperglycemia and insulin on the Central Nervous System (CNS) after TBI, an *ex vivo* protocol was developed. Twenty-four hours after TBI, hippocampal slices were exposed to a medium with normal and high glucose concentration and supplement with insulin. We observed an increase in the ratio of immunocontent of pIRS-1<sup>Ser612</sup>/IRS-1, with insulin in the medium, only at the sham group, indicating responsiveness of hippocampal cells to the addition of insulin. The same effect was not observed at the TBI group, a fact that may be associated with brain insulin brain resistance after TBI. There was a reduction of oxygen consumption in the TBI group compared to the sham group when were added substrates and inhibitors of the electron transport chain. This result showed a mitochondrial dysfunction after TBI. These effects cannot be associated with an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. Insulin supplementation did not show beneficial effects. Although mitochondrial dysfunction is related to loss of functionality and neuronal mortality, this study did not show changes in cellular viability. This study has shown there is a synergic effect of hyperglycemia and TBI increasing mortality and recognition memory deficit, effects avoid by treatment with insulin. Acutely, basal oxygen mitochondrial consumption and cell viability were not altered after TBI. However, mitochondrial deficits in the hippocampus, 24 hours after TBI, are shown due to the reduction of the oxygen consumption in response to the addition of ADP in when compared to the sham group; insulin supplementation reverts these effects. Our work emphasizes the importance of insulin in the maintenance of metabolic and memory functions in the TBI.

Keywords: TBI. Hyperglycemia. Insulin. Cognitive dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações patológicas no Traumatismo Cranioencefálico (TCE) .....	15
Figura 2 – Estrutura do receptor de insulina .....	20
Figura 3 – Transdução de sinais e vias ativadas pela insulina e IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) .....	21

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Parâmetros avaliados na Escala de Coma de Glasgow (GCS) .....	13
--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1. O TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)</b> .....	<b>12</b>
1.1.1 Definição e epidemiologia .....	12
1.1.2 Classificação do TCE .....	12
1.1.3 Fisiopatologia .....	14
1.1.3.1 Disfunção mitocondrial no TCE.....	14
1.1.4 Relação entre TCE e doenças neurodegenerativas.....	16
1.1.5 Manejo clínico dos pacientes com trauma.....	17
1.1.5.1 Hiperglicemia no TCE.....	17
1.1.6 Insulina no Sistema Nervoso Central .....	19
1.1.6.1 Sinalização de insulina .....	19
1.1.7 Efeitos da insulina na atividade mitocondrial.....	21
<b>1.2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>23</b>
<b>1.3 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
1.3.1 Objetivo geral.....	24
1.3.2 Objetivos específicos.....	24
<b>2 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>25</b>
<b>3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>74</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>
<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “JOURNAL OF NEUROTRAUMA”</b> .....	<b>80</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1. O TRAUMATISMO CRANIOENCEFÁLICO (TCE)**

#### **1.1.1 Definição e epidemiologia**

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é definido como uma interrupção na função normal do encéfalo causado por forças externas como colisão, golpe na cabeça e/ou penetração de objetos no crânio que podem levar ao comprometimento temporário ou permanente de funções cognitivas, físicas e psicossociais, associado com um estado de consciência diminuído ou alterado (CDC – *Center for Disease Control and Prevention*). Não é possível determinar a prevalência exata, ou seja, todos os casos existentes de TCE, pois nem todos eles são documentados, visto que a maioria das ocorrências são de TCE leves, não fatais ou sem lesões externas visíveis e por isso os pacientes não procuram à assistência hospitalar ou, quando o fazem, podem não necessitar de internação, dessa forma, não entrando para as estatísticas (GARDNER et al., 2014).

Estimativas apontam que o TCE afeta mais de 10 milhões de pessoas por ano. No Brasil, em 2012, o número de admissões hospitalares devido ao trauma foi de 67,1/100.000 habitantes, que gerou gasto de U\$\$ 84.709.145,91, apresentando taxa de letalidade de 7,44% (DE ALMEIDA et al., 2016). Nos Estados Unidos, em 2013, ocorreram cerca de 50 mil mortes e 282 mil hospitalizações devido ao TCE, produzindo um custo anual de aproximadamente U\$\$ 4 bilhões ao país, evidenciando que o TCE é um problema de saúde pública e econômico (TAYLOR et al., 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde o TCE se tornará uma das principais causas de morte e incapacidade até o ano de 2020 (HYDER et al., 2007).

#### **1.1.2 Classificação do TCE**

Os casos de TCE são classificados em leves, moderados ou graves de acordo com uma escala neurológica chamada de Escala de Coma de Glasgow (*Glasgow Coma Scale*, GCS), aferida dentro das primeiras 24 horas pós-TCE. Essa escala consiste na avaliação de três parâmetros (tabela 1): abertura dos olhos, resposta verbal e resposta motora, sendo que para cada ação é atribuída uma pontuação. A soma de cada pontuação gera um valor que varia de 15 a 3 e que,

quanto menor, mais grave é o trauma (FRIEDEN; HOURY; BALDWIN, 2015; TEASDALE; JENNETT, 1974).

Tabela 1 - Parâmetros avaliados na Escala de Coma de Glasgow (GCS).

<b>ESCALA DE COMA DE GLASGOW</b>	
<b>Habilidade</b>	
<b>Abertura dos olhos (AO)</b>	<b>Pontuação</b>
Espontânea	4
Ao som	3
À pressão	2
Ausente	1
Não testável**	NT
<b>Resposta verbal (RV)</b>	
Fala orientada	5
Fala confusa	4
Palavras, mas sem coerência	3
Sem palavras, somente sons	2
Ausente	1
Não testável**	NT
<b>Resposta motora (RM)</b>	
Normal, obedece comandos	6
Localizada, identifica local da dor	5
Flexão normal	4
Flexão anormal	3
Extensão	2
Ausente	1
Não testável**	NT
Pontuação: AO + RV + RM = 3 à 15	
TCE leve: 13-15	
TCE moderado: 9-12	
TCE grave: 3-8	

\*\*Paciente com algum tipo de limitação (por exemplo, pacientes intubados)

Fonte: Adaptado de GRAHAM, Teasdale. Forty years on: updating the Glasgow Coma Scale. *Nursing Times*, v. 110, n. 42, p. 12-16, out 2014.

Casos de TCE leves estão associados a confusão e perda leve e momentânea da memória, ao passo que os moderados e graves levam a inconsciência, perda de memória por longo período e letargia (GHAJAR, 2000). Entre as principais causas de TCE estão acidentes de trânsito, quedas, agressões e lesões associadas à prática de esportes de contato (ANDRADE et al., 2009). A maioria dos casos de TCE deve-se a quedas; os acidentes de trânsito são responsáveis pelo maior número de mortes de pacientes que sofrem trauma. Já a proporção de casos envolvendo atividades relacionadas ao esporte é impreciso, devido as limitações de dados. No entanto, estimativas do Sistema Eletrônico Nacional de Vigilância de Lesões (do inglês: *National Electronic Injury Surveillance System – All Injury Program*) indicam que as principais atividades esportivas associadas ao TCE são ciclismo, futebol americano, basquete e futebol (FRIEDEN; HOURY; BALDWIN, 2015). As faixas etárias de maior incidência compreende os jovens (dos 20 aos 29 anos) e os idosos (acima de 70 anos), sendo os homens 3,5 vezes mais afetados que mulheres (DE ALMEIDA et al., 2016).

### 1.1.3 Fisiopatologia

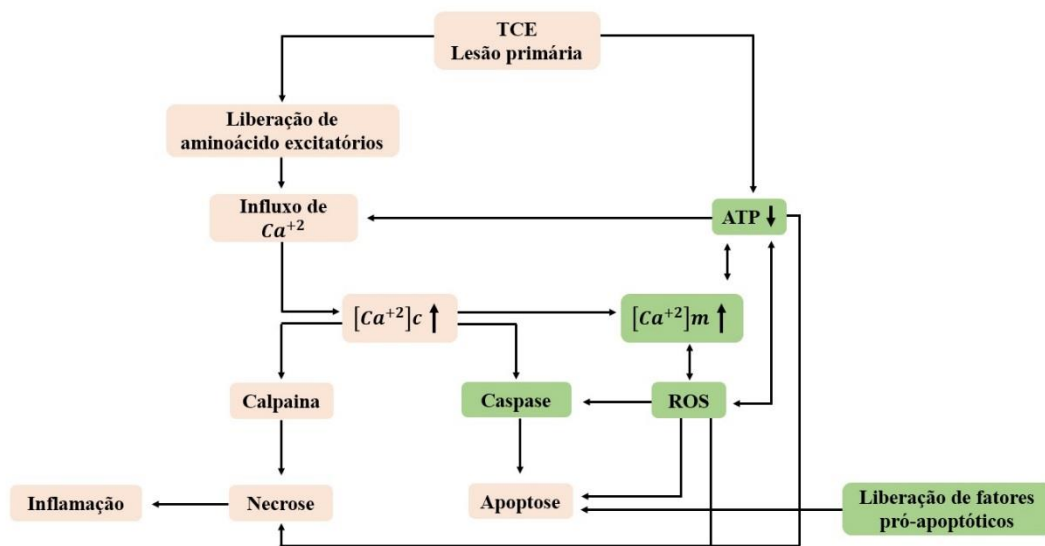
As lesões fisiopatológicas desencadeadas pelo TCE não ocorrem somente no momento do impacto; elas podem se estender por horas após a injúria e permanecer por meses ou até anos. Didaticamente, as lesões fisiopatológicas são classificadas em primárias e secundárias. Lesões primárias são decorrentes do dano mecânico do impacto, que levam a lesão no parênquima cerebral, ruptura de vasos e deformação de estruturas cerebrais. As lesões secundárias são caracterizadas por alterações cerebrais que ocorrem em resposta às lesões primárias. São causadas devido ao edema cerebral e diminuição do aporte de oxigênio, culminando com a iniciação de cascatas de eventos neurotóxicos como excitotoxicidade glutamatérgica, inflamação persistente, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), disfunção mitocondrial e ativação de vias apoptóticas e autofágicas que resulta em morte neuronal (ANDRADE et al., 2009; GHAJAR, 2000).

#### 1.1.3.1 Disfunção mitocondrial no TCE

A mitocôndria é uma organela citoplasmática conhecida por sua capacidade de produzir ATP, fonte de energia para a célula. Porém suas funções não se limitam a atividade energética. Sua atividade também está relacionada à regulação da produção de ROS, apoptose e tamponamento de cálcio intracelular (FISCHER et al., 2016). Desde meados dos anos 90 demonstra-se

que a disfunção mitocondrial está associada com a fisiopatologia do TCE (VINK et al., 1990; XIONG et al., 1997) (figura 1) e recentemente tem-se investido em pesquisas para potenciais estratégias terapêuticas em alvos mitocondriais.

Figura 1 - Alterações patológicas no Traumatismo Cranioencefálico (TCE).



A lesão primária causa lesão física do tecido, alteração no fluxo sanguíneo cerebral e como consequência, alteração no metabolismo e liberação de neurotransmissores excitatórios. Isso gera um desbalanço na homeostasia do  $\text{Ca}^{+2}$ , aumentando sua concentração no citosol ( $\text{Ca}^{+2}\text{c}$ ) e na mitocôndria ( $\text{Ca}^{+2}\text{m}$ ). Como consequência, há ativação de processos de morte celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e regulação de mediadores inflamatórios. Em verde destacam-se as principais alterações patológicas envolvendo a mitocôndria.

Fonte: Adaptado de CHENG, Gang et al. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, v. 167, n. 4, p. 699-719, abr 2012.

Há eventos que ocorrem pós-TCE, associados à mitocôndria, que são importantes para a progressão dos danos secundários (CHENG et al., 2012; HIEBERT et al., 2015):

- 1) Depleção de energia: a redução do fluxo sanguíneo cerebral leva à diminuição da produção e, consequente, esgotamento dos níveis de ATP celular, prejudicando a atividade das bombas de íons dependentes de ATP.
- 2) Despolarização da membrana da célula nervosa, levando a liberação excessiva de neurotransmissores excitatórios e ativação dos receptores NMDA, AMPA e canais de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Na}^{+2}$



voltagem dependentes; o  $\text{Ca}^{+2}$  é liberado de seus estoques e ocorre aumento anormal desse íon no citoplasma e na mitocôndria. O íon  $\text{Ca}^{+2}$  é conhecido por ser ativador de várias enzimas e vias associadas à produção de radicais livres, regulação de mediadores inflamatórios e morte celular.

3) Produção excessiva de ROS e liberação de fatores pro-apoptóticos pela mitocôndria, como por exemplo citocromo-C.

A ciclosporina A (CsA) é um fármaco que promove inibição do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, formado quando a mitocôndria encontra-se num ambiente de redução da síntese de ATP, aumento da produção de ROS e de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Esse poro permite a entrada dos íons  $\text{Ca}^{+2}$  na mitocôndria e liberação de proteínas pró-apoptóticas (WALLACE; FAN; PROCACCIO, 2011). Em 1999, Okonkwo e Povlishock mostraram que o tratamento com CsA 30 minutos antes do TCE reduz o número de mitocôndrias deformadas e, também, a imunorreatividade para proteína APP (OKONKWO; POVLISHOCK, 1999); bem como reduziu o volume de lesão e do tecido necrótico (SCHEFF; SULLIVAN, 1999). Dessa forma, demonstra-se que a modulação da atividade mitocondrial pode ser benéfica no TCE (KULBE et al., 2017).

#### **1.1.4 Relação entre TCE e doenças neurodegenerativas**

Atualmente o TCE é considerado fator de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como encefalopatia traumática crônica, Doença de Parkinson (DP) e Alzheimer (DA) (GIZA; DIFIORI, 2011; GUSKIEWICZ et al., 2005).

A encefalopatia traumática crônica (ETC) é uma doença neurodegenerativa fortemente associada com múltiplos e repetidos episódios de TCE, experienciado por atletas que praticam esportes de contato como boxeadores e jogadores de futebol americano. Os primeiros sinais do desenvolvimento dessa patologia são déficits cognitivos, como perda de memória, seguido por alterações motoras, na fala e por fim, a demência (GAVETT; STERN; MCKEE, 2012). Um estudo da Universidade de Boston, publicado em 2017, mostra que 99% dos jogadores de futebol americano da Liga Nacional de Futebol (*National Football League*, NFL) foram diagnosticados com ETC, evidenciando a relevância do TCE no desenvolvimento de patologias neurodegenerativas (MEZ et al., 2017).

Estudos *post mortem* demonstram acúmulo de emaranhados neurofibrilares, que consiste em agregados de proteína Tau hiperfosforilada, em cérebros de boxeadores e veteranos de

guerra, e acúmulo de proteína precursora amiloide (APP) nos axônios (GOLDSTEIN et al., 2013; MCKEE et al., 2009). Ainda, tem-se mostrado a presença de fragmentos A $\beta$  neurotóxicos, gerados por clivagem da APP e presença de placas A $\beta$  em pacientes que sofrem um único TCE (BLENNOW; HARDY; ZETTERBERG, 2012; SMITH, 2015), sendo as alterações, anteriormente citadas, marcadores característicos da DA. Outros autores revelaram acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína nos axônios e diminuição da substância nigra em atletas boxeadores, sugerindo um elo entre o TCE e a DP (IMPELLIZZERI et al., 2016; RUMALLA et al., 2016).

### **1.1.5 Manejo clínico dos pacientes com trauma**

Hipóxia e hipotensão são eventos comuns pós trauma e são responsáveis pelo agravamento das lesões secundárias. Portanto, os primeiros passos no manejo clínico desses pacientes estão centrados na manutenção da oxigenação e suporte hemodinâmico (DASH; CHAVALI, 2018; GHAJAR, 2000; QUINN; THURMAN; WILBERGER, 2000). Avaliação de fatores hemodinâmicos não anula a necessidade de um exame neurológico. Em geral utiliza-se imagens de ressonância magnética que complementam os dados obtidos na GCS (LE ROUX, 2013). Podem ocorrer também possíveis complicações como febre, convulsões, coagulopatia, hipermetabolismo cerebral e hiperglicemia. A hiperglicemia, em especial, é considerada uma grave complicação pós-TCE e está associada ao aumento da mortalidade e piora no prognóstico a longo prazo (KERBY et al., 2012; KOYFMAN et al., 2018).

#### **1.1.5.1 Hiperglicemia no TCE**

A hiperglicemia no TCE é definida pelo aumento da glicose sanguínea acima de 11.1 mmol/l (200 mg/dl) nas primeiras 48 horas pós-trauma em pacientes com infusão intravenosa contínua, livre de glicose, para manutenção de fluido basal (MELO et al., 2010). A hiperglicemia é uma resposta ao estresse e um reflexo metabólico pós-TCE e está associado com aumento de danos cerebrais isquêmicos, edema e morte celular (SHI et al., 2015). Entre os fatores relacionados com o desencadeamento da hiperglicemia estão 1) a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso autônomo simpático, que induzem o aumento de catecolaminas, cortisol, glucagon e hormônios do crescimento no sangue, que estimulam a glicogênólise (BOSARGE et al., 2015); 2) inflamação sistêmica, com liberação de TNF- $\alpha$  que diminui os níveis de genes adipócitos-específicos e aumenta os genes pré-adipócitos (RUAN et al.,

2002). Ainda, as respostas inflamatórias aumentam o nível do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e estimulam a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que induzem o aumento de glicose no sangue (GDEK-MICHALSKA et al., 2013); 3) disfunção da hipófise e hipotálamo, vitais para a homeostase de glicose, gerando aumento na gliconeogênese e redução na sensibilidade à insulina (SALEHI et al., 2007).

Em um ensaio clínico de 2012, Saadat e colaboradores mostraram 75% dos pacientes apresentaram hiperglicemia nas primeiras 24 horas e que os níveis de glicose no sangue dos pacientes que não sobreviveram foram significativamente maiores nos três primeiros dias de internação, quando comparado ao grupo de sobreviventes (SAADAT et al., 2012). Assim, a hiperglicemia precoce está associada à desfechos desfavoráveis e a persistência desse estado é um preditor da mortalidade nos pacientes (ALVIS-MIRANDA et al., 2014; FU et al., 2017; YOUNG et al., 2017). Observa-se também que os pacientes que desenvolvem hiperglicemia são aqueles com menores valores na GCS, indicando que a severidade do trauma é um fator associado ao desbalanço glicêmico (KHAJAVIKHAN et al., 2016).

O manejo clínico para o controle da glicemia periférica se dá por administração de insulina. Porém, apesar das evidências de efeitos positivos, essa diretriz ainda apresenta controvérsias pois não se tem consenso sobre qual é o nível glicêmico e a quantidade de insulina ideais para se ter resultados benéficos, uma vez que o controle glicêmico rigoroso com insulino terapia - manutenção da glicemia abaixo de 110mg/dl - está associado com o surgimento de episódios de hipoglicemia (glicose abaixo de 40mg/dl), que gera efeitos deletérios também à nível de Sistema Nervoso Central (SNC) (AZEVEDO et al., 2007; EAKINS, 2009). Portanto, as consequências diretas da hiperglicemia e intervenções terapêuticas corretas para controlar o nível de glicose no sangue permanecem desconhecidas (SHERIFF; HINSON, 2015).

Um estudo com pacientes pós-trauma do Hospital Universitário de Zurique, tratados com insulino terapia, mostrou que a manutenção da glicose na faixa de 90 à 144 mg/dl é benéfica na primeira semana, pois há redução da taxa de mortalidade e diminuição da pressão intracraniana (PIC). Na segunda semana, o grupo com glicemia na faixa de 63 a 117 mg/dl, foi aquele que apresentou redução na incidência de aumentos na PIC, de infecções e melhora no prognóstico clínico, indicando que o controle glicêmico necessita ser temporariamente adaptado (MEIER et al., 2008).

### 1.1.6 Insulina no Sistema Nervoso Central

Nos últimos anos, tem-se descoberto que o cérebro é alvo da ação do hormônio insulina, teoria sustentada pela identificação de receptores de insulina (RI) no cérebro bem como a capacidade da passagem de insulina pela barreira hematoencefálica (BHE) e a síntese desse hormônio no tecido cerebral (HOPKINS; WILLIAMS, 1997; KARELINA et al., 2016). Os RI estão presentes em todas as regiões do cérebro; as áreas de maior concentração são no hipocampo, córtex, hipotálamo e bulbo olfatório (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012).

A insulina é conhecida como o principal regulador dos níveis de glicose no sangue, estimulando a captação de glicose pelos tecidos periféricos, via transportador GLUT-4 (GLUT, do inglês *glucose transportes*). O cérebro era considerado um órgão insensível à insulina, uma vez que os transportadores de glicose presentes na BHE (GLUT-1) e nas células neuronais (GLUT-1 em astrócitos; GLUT-3 em neurônios) são insulino-independentes. Porém, cresce o número de estudos que mostram que a insulina desempenha um papel neuroregulatório, com ação na regulação do comportamento alimentar, desenvolvimento neuronal, com efeitos na neuroplasticidade, e processos cognitivos, incluindo memória, aprendizado e atenção (GRAY; MEIJER; BARRETT, 2014; SHI et al., 2015).

Observa-se o aumento da insulina no líquido cerebrospinal (LCE) após infusão de insulina via intravenosa em modelos animais, comprovando que a insulina atravessa a BHE (BANKS et al., 1997; MARGOLIS; ALTSZULER, 1967). Isso ocorre via transportador presente na BHE, por um mecanismo de saturação, sendo regulado por diversos fatores como glicocorticoides, situações patofisiológicas e estados de jejum ou alimentado (BLÁZQUEZ et al., 2014).

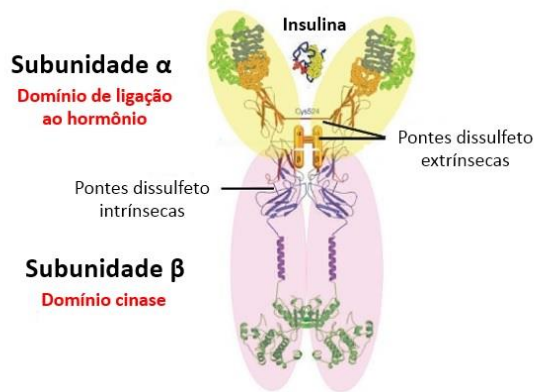
O nível de insulina no LCE é determinado pela concentração periférica e pela produção no SNC (BANKS; OWEN; ERICKSON, 2012). A confirmação da síntese de insulina no cérebro tem sido baseada em diferentes experimentos, que verificaram a presença do peptídeo-C e de mRNA de insulina em diferentes regiões do cérebro. O peptídeo-C é gerado na formação de insulina, por clivagem da pró-insulina, e é amplamente utilizado para dosar a produção de insulina endógena (BLÁZQUEZ et al., 2014).

#### 1.1.6.1 Sinalização de insulina

Os receptores de insulina (RI) são proteínas heterotetraméricas, compostos por duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , unidas por pontes dissulfeto (figura 2). Há duas isoformas,

IR-B e IR-A, que estão presentes em todas as estruturas do cérebro; porém a IR-A é a isoforma de maior prevalência no SNC (TATULIAN, 2015).

Figura 2 - Estrutura do receptor de insulina

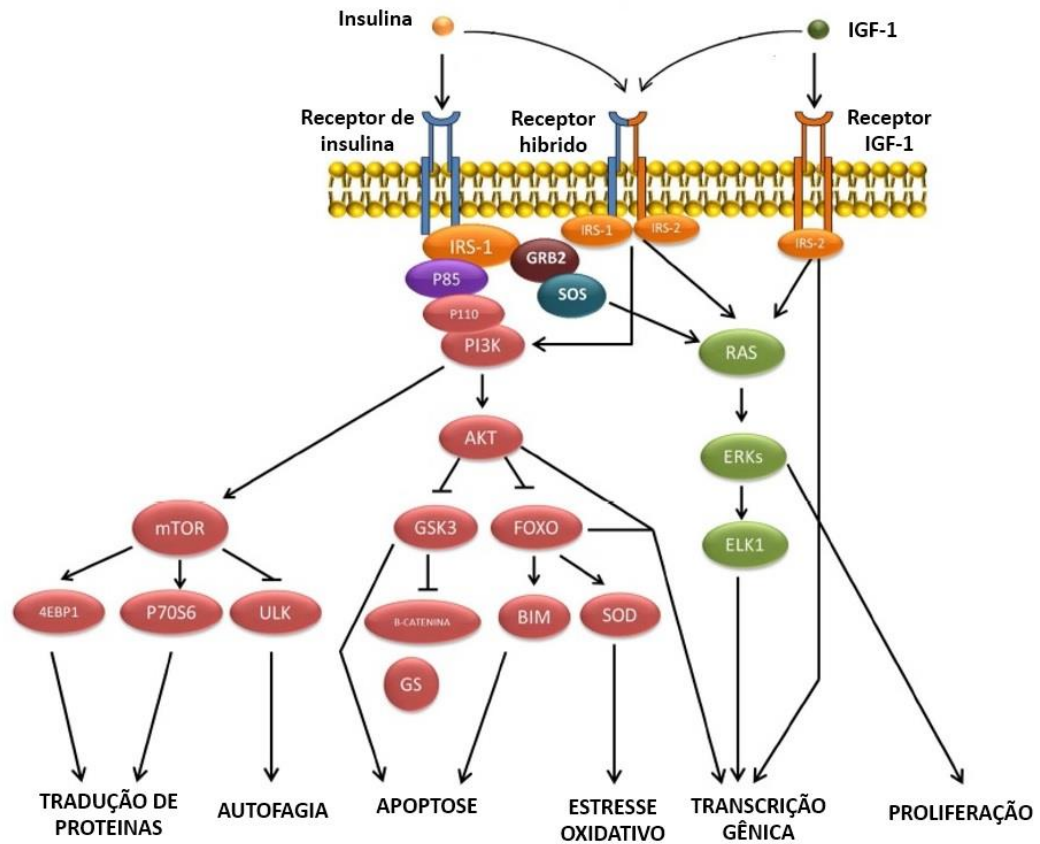


Fonte: CHIU, Shu Ling; CLINE, Hollis T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. **Neural Development**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2010

A insulina se liga na subunidade  $\alpha$  do receptor e promove a fosforilação do sítio tirosina-cinase das subunidades  $\beta$ , ativando-o. O receptor é internalizado e se inicia a ativação das cascatas intracelulares dependentes de insulina. As primeiras proteínas serem fosforiladas e ativadas são as pertencentes à família dos substratos receptor de insulina (IRS), o qual apresenta dois subtipos: IRS-1 e IRS-2. As respostas mediadas por IRS-1 atuam nas vias de translocação proteica, apoptose, estresse oxidativo e autofagia. Já as respostas mediadas pela IRS-2 levam a proliferação e transcrição gênica (BLÁZQUEZ et al., 2014; SCHULINGKAMP et al., 2000).

A sinalização de insulina é mediada por duas cascatas de sinalização: PI3K-AKT, que estão relacionados com os processos de tradução proteica, autofagia, apoptose e estresse oxidativo; e RAS-MAPK/ERK, promovendo diferenciação, proliferação e morte celular (figura 3) (BIESSELS; REAGAN, 2015; PLUM; SCHUBERT; BRÜNING, 2005).

Figura 3 - Transdução de sinais e vias ativadas pela insulina e IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1).



Fonte: BLÁZQUEZ, Enrique et al. Insulin in the brain: its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and Alzheimer's disease. **Frontiers in Endocrinology**, v.5, p. 1-21, out 2014.

### 1.1.7 Efeitos da insulina na atividade mitocondrial

Os efeitos da insulina na atividade mitocondrial é amplamente explorada em estudos que abordam os tecidos periféricos, como o músculo esquelético e fígado e evidenciam uma forte correlação entre a resistência à insulina e o prejuízo na função mitocondrial (MONTGOMERY; TURNER, 2014). Observa-se redução na atividade oxidativa e fosforilativa da mitocôndria, devido a diminuição da atividade das enzimas oxidativas, em pacientes e modelos animais com resistência à insulina. A presença desse hormônio promove aumento na expressão de proteínas mitocondriais, atividade de enzimas oxidativas e síntese de ATP, evidenciando a importância da insulina na biogênese mitocondrial (CHENG; TSENG; WHITE, 2010).

Além disso, a insulina apresenta efeito na regulação do processo de fusão mitocondrial em cardiomiócitos por ação na via de sinalização Akt-mTOR-NFkB-Opa-1 (PARRA et al., 2014). A fusão é um processo que ocorre quando a célula necessita de uma alta produção de ATP durante alta atividade metabólica e/ou estresse. Formam-se redes mitocondriais estendidas, que é regulado pela proteína Opa-1 (*Optic Atrophy 1*) e Mfn1/2 (*Mitofusin1/2*) (WESTERMANN, 2012).

No tecido cerebral, os estudos são mais escassos. Porém há evidências de que a insulina promove redução da produção de peróxido pela mitocôndria e evita alteração no potencial de membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de cérebros de ratos (MULLER et al., 2013). Ainda, são observadas alterações no consumo de oxigênio mitocondrial em mitocôndrias cerebrais de modelos animais de hiperglicemia induzido por streptozotocina (STZ), bem como redução na concentração de ATP e aumento na produção de peróxido de hidrogênio, parâmetros que foram revertidos pelo tratamento com insulina (MOREIRA et al., 2006, 2005). Dessa forma, sugere-se a insulina como um regulador de alvos mitocondriais, podendo desempenhar um papel importante na modulação da disfunção mitocondrial observadas pós-TCE. Porém, os efeitos da insulina sobre a atividade mitocondrial cerebral ainda permanecem pouco claros, sendo um tema que necessita de maior aprofundamento.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O TCE é uma patologia com alta frequência na sociedade e afeta fortemente a qualidade de vida dos indivíduos. As lesões associadas ao trauma geram uma gama de alterações no SNC e aprimorar os conhecimentos acerca das vias associadas a essa patologia pode ser benéfico para acelerar a recuperação do paciente, diminuir os danos cognitivos e neurológicos e buscar por possíveis agentes terapêuticos. Há muitos fatores que agravam o prognóstico do paciente, muitos dos quais apresentam um protocolo padrão de manejo clínico. No entanto, a hiperglicemia, é uma condição para a qual as intervenções terapêuticas apresentam controvérsias. Sabe-se que controlar a glicemia é extremamente importante para a melhora no prognóstico e o controle glicêmico com administração de insulina tem-se mostrado eficaz em muitos casos. A insulina é conhecida por ser o principal regulador da glicemia periférica e se tem demonstrado seu efeito no SNC como agente neuroprotetor e neuromodulador. Visto que a insulina é utilizada no tratamento de pacientes com TCE e que, além de controlar a glicemia, ela apresenta funções neurometabólicas importantes, torna-se relevante estudar os efeitos associados à ação da insulina no TCE, contribuindo para o entendimento dos processos que metabólicos que ocorrem pós-trauma.



## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da hiperglicemia e tratamento com insulina periférica na morbidade e mortalidade, em um modelo animal de TCE, além de avaliar os efeitos desse hormônio nos desfechos celulares associados à morte neuronal e modulação da neuroenergética mitocondrial pós-trauma.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos cognitivos do tratamento com insulina e a mortalidade dos animais pós-TCE.
- Verificar alterações em proteínas envolvidas na sinalização de insulina tais como IR, IRS, AKT, GSK3b.
- Avaliar viabilidade celular.
- Avaliar parâmetros mitocondriais de consumo de O<sub>2</sub>, atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, produção de peróxido de hidrogênio, potencial de membrana mitocondrial.

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

**Periódico:** Journal of Neurotrauma

**Título:** Controle glicêmico com administração de insulina previne déficit na memória de reconhecimento em camundongos hiperglicêmicos submetidos ao traumatismo cranioencefálico.

**Normas do periódico:** disponível em <https://home.liebertpub.com/publications/journal-of-neurotrauma/39/for-authors>

**Controle glicêmico com administração de insulina previne déficit na memória de reconhecimento em camundongos hiperglicêmicos submetidos ao traumatismo cranioencefálico.**

Mônia Sartor<sup>1</sup>, Nathan Ryzewski Strogulski *MSc*<sup>1</sup>, Radhall Bruce Kreismann Carteri *MSc*<sup>1</sup>, Marcelo Salimen Rodolphi *MSc*<sup>1</sup>, Afonso Kopczynski de Carvalho<sup>1</sup>, Luis Valmor Cruz Portela *PhD*<sup>1</sup>, Gisele Hansel *PhD*<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Porto Alegre - RS, Brasil.

<sup>2</sup> Smith Lab, Departamento de Neurocirurgia, Universidade da Pensilvânia, Filadélfia-PA, Estados Unidos da América.

\*Autor correspondente

Gisele Hansel: Smith Lab, Departamento de Neurocirurgia, Universidade da Pensilvânia, Filadélfia-PA, Estados Unidos da América.

Endereço de email: [gihansel@gmail.com](mailto:gihansel@gmail.com)

***Table of Contents title:***

Implicações da hiperglicemia no TCE: efeitos positivos do tratamento com insulina

***Running title:***

Hiperglicemia no TCE: efeitos positivos da insulina

## Lista de Autores

Mônia Sartor: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Endereço de email: [monia\\_sartor@hotmail.com](mailto:monia_sartor@hotmail.com)

Nathan Ryzewski Strogulski, *MSc*: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Endereço de e-mail: [n.strogulski@gmail.com](mailto:n.strogulski@gmail.com)

Radhall Bruce Kreismann Carteri, *MSc*: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Endereço de e-mail: [rcarteri@outlook.com](mailto:rcarteri@outlook.com)

Marcelo Salimen Rodolphi, *MSc*: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Endereço de e-mail: [marcsalimen@gmail.com](mailto:marcsalimen@gmail.com)

Afonso Kopczynski de Carvalho: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Endereço de e-mail: [afonsokcarvalho@gmail.com](mailto:afonsokcarvalho@gmail.com)

Luis Valmor Cruz Portela, *PhD*: Laboratório de Neurotrauma e Biomarcadores, Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2600, 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel: 55 51 33085558. Fax: 55 51 33085544. Endereço de e-mail: [roskaportela@gmail.com](mailto:roskaportela@gmail.com)

Gisele Hansel, *PhD*, (autor correspondente): Smith Lab, Departamento de Neurocirurgia, Universidade da Pensilvânia, Towne Bulding, 220 S 33rd St., sala 283, 19104, Filadélfia-PA, Estados Unidos da América. Endereço de e-mail: [gihansel@gmail.com](mailto:gihansel@gmail.com)

## RESUMO

Após o traumatismo crânioencefálico (TCE), a hiperglicemia é a ocorrência mais comum, associada ao aumento da mortalidade e piora no prognóstico clínico e neurológico. A administração de insulina, nesses casos, favorece a recuperação do paciente. Além de controlar a glicemia periférica, esse hormônio apresenta efeitos neurotróficos e neurometabólicos que podem favorecer a recuperação pós-TCE. *Objetivo:* investigar os efeitos da insulina na cognição, metabolismo neuronal e desfechos celulares pós-TCE. Para tal, utilizamos protocolos *in vivo* e *ex vivo*, avaliando efeitos crônicos e agudos da insulina no TCE. *Resultados:* a curva de dose-tempo de insulina mostrou que a dose de 20U/kg foi a mais efetiva em controlar a glicemia. Observamos que os animais TCE apresentam atividade hiperlocomotora além de um efeito combinado entre TCE e hiperglicemia no aumento da mortalidade e na presença de déficit na memória de reconhecimento, fatores que são prevenidos pelo tratamento com insulina. Os experimentos *ex vivo*, em fatias hipocâmpais, revelou que o tratamento com insulina foi responsivo somente no grupo sham; há comprometimento na síntese de ATP 24 h pós-TCE, embora o consumo mitocondrial de oxigênio basal não é alterado e não seja observado variações na viabilidade celular. *Conclusão:* a hiperglicemia contribui para o prejuízo na memória de reconhecimento e aumento na mortalidade após o TCE. Ainda, o TCE leva à redução no consumo de oxigênio em concentrações saturantes de ADP, indicando um possível dano na ATP-sintase, no hipocampo, 24 h após o trauma, sendo esse efeito anulado na presença de insulina.

Palavras chave: TCE. Hiperglicemia. Insulina. Memória de reconhecimento

## Introdução

O traumatismo cranioencefálico (TCE) é considerado um importante problema de saúde pública e econômica em todo mundo.<sup>1-3</sup> Nos Estados Unidos, um terço das mortes por causas externas são atribuídas ao TCE e foram registrados 2,5 milhões de casos somente em 2010 (CDC – *Center for Disease Control and Prevention*). Os danos desencadeados por essa afecção alteram o comportamento físico, emocional e psíquico, afetando negativamente a qualidade de vida dos indivíduos.<sup>3-5</sup> Fisiopatologicamente, o TCE causa lesões no parênquima cerebral e estruturas associadas que culminam com a ativação de cascatas de eventos neurotóxicos como inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), disfunção mitocondrial e ativação de vias apoptóticas e autofágicas.<sup>6-13</sup>

Dentre as complicações secundárias ao TCE, a hiperglicemia é o evento mais comum, definida pelo aumento da glicose sanguínea acima de 200 mg/dl nas primeiras 48 horas após o trauma.<sup>14</sup> Disfunções no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a inflamação são algumas das alterações que promovem a ativação da glicogenólise e o aumento da glicose no sangue, caracterizando o quadro de hiperglicemia, efeito que está fortemente associado com a mortalidade pós-trauma, piora no prognóstico clínico e aumento das complicações neurológicas a longo prazo.<sup>15-19</sup> De acordo com Saadat e colaboradores (2012), 75% dos pacientes com TCE desenvolvem hiperglicemia dentro de 24 horas, apresentando mortalidade de 37%, contrastando com a ausência de mortalidade, neste mesmo período, nos pacientes em que a glicemia é normal.<sup>18</sup> Esse efeito se intensifica em casos de hiperglicemia prolongada, no qual se observa mortalidade de 83% e 80% em pacientes com persistência da glicose elevada por 48 e 72 horas respectivamente.<sup>20</sup> A hiperglicemia propicia a ocorrência de acidose, distúrbios eletrolíticos, manutenção da inflamação e alteração da barreira hematoencefálica, atuando como um facilitador da progressão dos danos secundários e exacerba o dano às células nervosas e estruturas cerebrais.<sup>8,21</sup>

A administração periférica do hormônio insulina é a ferramenta utilizada nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) para controle e manutenção dos níveis sanguíneos de glicose em valores normais nos pacientes com TCE.<sup>22-24</sup> Estudos mostram que a introdução de um protocolo de manutenção dos níveis glicêmicos entre 140 e 180 mg/dL, reduz em 30% a mortalidade nos pacientes e favorece a recuperação pós-trauma.<sup>25,26</sup> Além de atuar periféricamente na manutenção da glicemia, a sinalização de insulina também desempenha efeitos importantes no Sistema Nervoso Central (SNC).

As funções metabólicas do corpo, tais como comportamento alimentar e manutenção energética, estão relacionadas com a ação da insulina no cérebro.<sup>27-31</sup> Nos últimos anos, estudos mostram que esse hormônio apresenta efeitos importantes também para a memória e cognição, com ação funcional em diferentes regiões do cérebro, em especial nas áreas do hipocampo envolvidas no reconhecimento e memórias globais<sup>32-34</sup>, além de apresentar efeitos neuroprotetores e de neuroplasticidade, atuando contra a toxicidade beta-amilóide, isquemia, estresse oxidativo e apoptose.<sup>35,36</sup>

Visto que a terapia com insulina é altamente utilizada na clínica em pacientes com TCE e que esse hormônio é efetivo no controle da glicemia e apresenta funções neurometabólicas importantes, buscamos investigar os efeitos da insulina na cognição, metabolismo neuronal e desfechos celulares pós-TCE.

## **Materiais e métodos**

**Animais:** foram utilizados camundongos C57BL6, machos e adultos (60-90 dias), oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, mantidos em caixas-moradias sob condições padrões de biotério (umidade e temperatura controlados; ciclo claro-escuro de 12 horas; comida e água *ad libitum*). Para ambientação ao biotério, os animais permaneceram por 15 dias em suas caixas moradias sem manipulação experimental. Após esse período, foram submetidos a experimentos *in vivo* e *ex vivo*. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (número do protocolo CEUA: 29844).

### **PROTOCOLO 1: indução do estado hiperglicêmico e tratamento com insulina periférica**

**Curva glicêmica para escolha da dose de insulina:** os animais receberam injeção de streptozotocina (STZ, 150 mg/kg, via intraperitoneal, Sigma) para indução do estado hiperglicêmico.<sup>37</sup> Três dias após, fez-se a dosagem da glicemia em jejum de 2 horas (h) e os animais foram divididos em três grupos diferentes, por dose de insulina (5, 10 ou 20 U/kg; LANTUS® - insulina glargina). Utilizou-se via subcutânea para administração das injeções, realizada em intervalos de 12 h, às 7:00 e às 19:00 h. Nos dias 8, 17 e 25 pós-tratamento, fez-se a dosagem da glicemia em jejum de 0, 2, 4 e 6 h. A dosagem da glicose sanguínea foi realizada utilizando um glicosímetro (OnCall® Plus) e o sangue foi coletado por punção na cauda.<sup>38</sup>

**Divisão dos grupos experimentais:** uma segunda leva de animais recebeu injeção de 150 mg/kg de STZ - dia zero - via intraperitoneal (desenho experimental, figura 1). Três dias após a injeção, fez-se a dosagem da glicemia em jejum de 2 h. Os animais foram divididos em quatro



grupos: sham salina (SS), sham insulina (SI), TCE salina (TS) e TCE insulina (TI). Posteriormente, iniciou-se o tratamento com insulina 20 U/kg nos grupos insulina; os animais do grupo salina receberam volumes equivalentes em salina.

**Modelo de indução do TCE:** utilizou-se o modelo de impacto cortical controlado (ICC) que mimetiza um TCE aberto e moderado.<sup>39</sup> No dia 10, os animais foram anestesiados com anestesia inalatória que consiste em uma mistura de oxigênio e isoflurano (5% e 2% de anestésico para indução e manutenção, respectivamente), e colocados no estereotáxico. Fez-se assepsia da pele com etanol 70%, seguido por incisão longitudinal na região central da cabeça. Para expor a dura mater, realizou-se uma craniotomia de 4 mm de diâmetro, posicionada no centro do Bregma e Lambda e a 0,5 mm da linha média. O equipamento de ICC (Leica Biosystems) é acoplado ao estereotáxico e apresenta um pistão de 3 mm de diâmetro que foi posicionado rente à dura mater. O impacto foi realizado com os seguintes parâmetros: velocidade de 5,7 m/s, tempo de permanência de 100 ms e profundidade de impacto de 1,5 mm. A área da lesão foi recoberta por material acrílico e se fez a sutura da pele. Todos os animais receberam cuidados pós-operatórios e posteriormente foram alocados em suas respectivas caixas-moradia. Os animais controle (sham) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, exceto à indução do ICC.<sup>40</sup>

**Teste de reconhecimento de objetos (RO):** no dia 16, os animais foram expostos ao aparato (30 cm x 30 cm x 60 cm) 48 e 24 h antes da realização do teste de RO, por 15 minutos, para sessões de habituação. No dia seguinte, os animais foram submetidos a uma fase de treino - sessão de aquisição - em que dois objetos idênticos foram alocados no centro do aparato de forma equidistante. A sessão teste foi realizada 90 minutos após o treino e um dos objetos foi substituído, sendo apresentado ao animal um objeto novo e um familiar. Em cada sessão, os

animais puderam explorar livremente o ambiente e objetos por 10 minutos. O índice de reconhecimento foi definido como  $(TN/T_{total}) * 100$ , onde TN = tempo gasto explorando o novo objeto;  $T_{total}$  = tempo de exploração do objeto novo e familiar. <sup>41,42</sup>

## **PROTOCOLO 2: Estimulação com insulina em fatias de hipocampo**

**Preparação de fatias de hipocampo:** uma terceira leva de animais foi submetido à indução do TCE e 24 h após foram eutanasiados por decaptação. Os cérebros foram coletados e o hipocampo ipsilateral a cirurgia foi dissecado e fatiado com McIlwain Tissue Chopper na espessura de 400  $\mu$ m. As fatias foram separadas e incubadas em tampão HBBS (em mM: NaCl 137;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,63;  $\text{NaHCO}_3$  4,17; KCl 5,36;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44;  $\text{CaCl}_2$  1,26;  $\text{MgSO}_4$  0,41;  $\text{MgCl}_2$  0,49 e glicose 5,5; pH 7,4) à 37°C por 30 minutos para estabilização. Após, o meio foi retirado e as fatias foram incubadas em meio HBSS hiper, com alta concentração de glicose (22,2 mM) ou HBSS normo, com concentrações normais de glicose (5,5 mM), seguido por adição de insulina a 10 nM (LANTUS® - insulina glargina). Parte das amostras não recebeu insulina; esses grupos servem como controle da adição de insulina. Realizou-se incubação à 37°C por 30 minutos. Dessa forma, obtivemos os seguintes grupos experimentais:

Grupo TCE em meio normo com adição de insulina OU sem insulina.

Grupo TCE em meio hiper com adição de insulina OU sem insulina.

Grupo sham em meio normo com adição de insulina OU sem insulina.

Grupo sham em meio hiper com adição de insulina OU sem insulina.

**Imunoquantificação (*Western blot*):** após a última incubação, as fatias foram coletadas e homogeneizadas em tampão NP-40 (NaCl 150 mmol/L, Triton X-100 1%, Tris 50 mmol/L, pH 8) com coquetel de inibidores de protease (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, 10%) e fosfatase

(Phosphatase Inhibitor Cocktail B, Santa Cruz, 10%). A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit – Thermo Scientific). Após normalização das amostras, 20 µg de proteína foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida 10 ou 12%, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*GE Healthcare Life Sciences*, 0,45 µm). Para impedir ligações inespecíficas dos anticorpos à membrana, estas foram bloqueadas por 1 h com TTBS (Tween-Tris buffered saline, Tris–HCl 100 mM; Tween 20 0,05%; pH 7.5) contendo 5% de albumina bovina (InLab). Posteriormente, as membranas foram incubadas overnight com os anticorpos-primário de interesse: phospho-IRS1 Ser<sup>612</sup> (Cell Signaling), anti-IRS1 (abcam), phospho-GSK3β Ser<sup>9</sup> (Cell Signaling), anti-GSK3β (*abcam*) e actina (Sigma). As membranas foram lavadas com TTBS e incubadas por 2 h, com anticorpo secundário anti-mouse (1:10000, GE Healthcare Life Sciences) ou anti-rabbit (1:25000, Sigma). A revelação por quimiluminescência foi realizada no equipamento Iluminescent Image Analyzer (GE) e a intensidade das bandas foram quantificadas pelo software Image J. Os resultados são expressos por porcentagem do controle.

**Respirometria:** parâmetros mitocondriais foram avaliados utilizando um respirômetro de alta-resolução em tempo real (*Oxygraph-2k*). Após a última incubação, as amostras foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (em mM: TRIS 10; sacarose 320; EDTA 1; pH 7,4), suplementado com 0,005 mg/ml de digitonina. 150 µl de amostra foram adicionadas na câmara do respirômetro, com temperatura constante (37°C), contendo 2 ml de tampão de respiração (em mM: TRIS 10; manitol 320; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5; KCl 50; MgCl<sub>2</sub> 4; EDTA 0,73; pH 7,4). O protocolo, adaptado de Gnaiger, consiste em adições sequenciais de substratos metabólicos e inibidores dos complexos da cadeia de transporte de elétrons para avaliar consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) e atividade dos complexos mitocondriais.<sup>43</sup> A respiração mitocondrial não fosforilativa (Leak)

é determinada pela estimulação das mitocôndrias com PMG (piruvato 0,8 M; malato 1 M; glutamato 1 M), seguido pela adição de adenosina difosfato (ADP 0,1 M), para determinar capacidade de fosforilação oxidativa do complexo I (OXPHOS CI). Posteriormente, acrescentou-se succinato (1 M) para avaliar a respiração advinda dos complexos I e II da cadeia de transporte de elétrons (OXPHOS CI e CII) e ADP para determinação da atividade fosforilativa mitocondrial máxima (máximo OXPHOS). Adiciona-se rotenona (1 mM), para avaliação da funcionalidade do complexo II (OXPHOS CII), seguido por cianeto de potássio (KCN 0,1M), para determinação do consumo de oxigênio não mitocondrial. Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína das amostras e expressos em % do fluxo de O<sub>2</sub> por unidade do basal de cada amostra.

**Produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):** a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada simultaneamente à respirometria utilizando Fluorescence-Sensor Green do *O2k-Fluorescence LED2-Module* que mede a produção de peróxido. O tampão foi suplementado com *Amplex® UltraRed* (2 mM), HRP (*horseradishperoxidase*, 1 U/ml) e SOD (superóxido dismutase, 5 U/ml). O método é baseado na oxidação do Amplex dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, à um componente fluorescente, catalisado pela HRP. Os resultados são expressos em porcentagem da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> basal.

**Ensaio colorimétrico de MTT:** para avaliar a viabilidade celular das fatias, utilizou-se a técnica colorimétrica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Após a última incubação, retirou-se o meio e se acrescentou 0,5 mg/ml de MTT (Sigma) em PBS (*Phosphate-buffered saline*, NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) e as fatias foram incubadas a 37°C por 45 minutos. O formazan, de coloração roxa, formado durante esse período, é solubilizado em DMSO (*dimethylsulfoxide*) e medido a 560 e 630 nm utilizando o equipamento Spectramax M5 (Molecular Devices). As fatias foram coletadas e

deixadas overnight na estufa para obtenção do peso das mesmas. Os resultados são normalizados pelo peso e expressos em valores absolutos.

**Análise estatística:** as análises foram processadas utilizando o software *GraphPad Prism 6*. A avaliação da normalidade foi realizada utilizando o teste de Kolmogorof-Smirnov. Os dados foram avaliados pelo teste de variância com duas vias (*Two-way Analysis of Variance – ANOVA*), com *post-hoc* de Bonferroni, considerando diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$ . Os resultados são expressos por média ou média + SEM.

## Resultados

### *Curva de doses de insulina*

Para determinar a dose de insulina a ser administrada, realizamos uma curva de dose-tempo com doses de 5, 10 e 20 U/kg de insulina. A dose de 5 U/kg foi a menos efetiva pois reduziu a glicemia somente nas duas primeiras horas após a injeção, voltando a níveis elevados em quatro horas ( $p < 0.001$ , figura 2A). A dose intermediária, de 10 U/kg de insulina, reduziu a glicemia nas primeiras duas horas após a injeção e manteve os animais em normoglicemia por até 4 horas, no 13° e 21° dia de tratamento ( $p < 0.0001$ , figura 2B). Já o tratamento com 20 U/kg manteve a glicemia estável por até seis horas após a injeção, no 13° e 21° dia de tratamento ( $p < 0.0001$ , figura 2C), mostrando ser a dose mais efetiva para o tratamento de animais hiperglicêmicos, em nosso modelo de STZ em estudo, sendo esta a dose escolhida para os experimentos seguintes.

### *Indução do estado hiperglicêmico e tratamento com insulina 20 U/kg*

Os animais receberam injeção STZ via intraperitoneal e a glicemia foi mensurada três dias após a administração. Nos roedores, considera-se hiperglicemia os valores glicêmicos acima de 200 mg/dl em jejum.<sup>37</sup> A glicemia da maioria dos animais apresentou-se acima do valor de referência, confirmando a indução do estado hiperglicêmico (figura 3A). Apenas 2,5% dos animais não exibiram essa condição e foram excluídos do estudo. Observou-se também sintomas clássicos desenvolvidos em casos de hiperglicemia como poliúria (dados não mostrados) e poli-dipsia, caracterizado pelo aumento do consumo de água nos animais que receberam STZ (figura 3B). O peso corporal dos animais foi monitorado ao longo de todo o experimento e avaliado com base no delta do peso (*peso no dia 19 – peso no dia 4*) e se observou redução do peso corporal em todos os grupos (figura 3D).

O tratamento com insulina 20 U/kg iniciou no 4º dia de experimento (figura 1, desenho experimental). A glicemia casual foi monitorada no momento da cirurgia para se ter controle deste parâmetro entre os grupos (figura 3C) e constatamos que durante o ICC a glicemia do grupo TCE insulina (TI) estava controlada e significativamente menor que o grupo TCE salina (TS) ( $p=0,001$ ).

Dessa forma o STZ foi eficaz na indução do estado hiperglicêmico e o tratamento com insulina 20 U/kg foi capaz de manter os níveis glicêmicos controlados no momento da cirurgia e ao longo de todo protocolo experimental.

#### *Hiperglicemia provoca aumento na mortalidade pós-TCE*

A mortalidade pós-TCE é significativamente maior no grupo TS ( $p=0.037$ ), no qual a porcentagem de sobrevivência foi de apenas 55,5% (figura 5), dados que corroboram com estudos clínicos. Observa-se efeito combinado entre TCE e hiperglicemia, uma vez que somente esse grupo apresentou taxas de mortalidade significativamente maiores. Os animais sham, tanto os hiperglicêmicos como os tratados com insulina, apresentaram sobrevivência de 100%.

#### *Insulina previne déficit na memória de reconhecimento causado pelo TCE.*

Para avaliar a memória de reconhecimento, os animais foram submetidos ao teste de reconhecimento de objetos (RO). As sessões de habituação ao aparato indicam que os animais TCE exibem aumento na atividade locomotora, visto que percorreram uma distância maior no aparato e apresentaram velocidade média maior, quando comparada aos animais sham, nas duas sessões ( $p<0.0001$ , figura 6). Na análise minuto a minuto do teste, observamos redução da distância percorrida no aparato nos minutos finais do teste indicando que tanto os animais sham

quanto os TCE habituaram ao aparato (figura 7). Para avaliar os efeitos do TCE na memória de reconhecimento, realizamos o teste de reconhecimento de objetos. Na sessão de aquisição, todos os grupos exploraram de maneira uniforme ambos os objetos, indicando que não houve preferência por um dos objetos e/ou lados do aparato ( $p_{\text{objetos}}=0,99$ ; figura 8A). Em relação ao tempo total de exploração dos objetos (tempo no objeto A + tempo no objeto B), os resultados mostram que o grupo TS passou mais tempo explorando-os, quando comparado ao grupo TI ( $p=0,009$ ; figura 8B), assinalando maior familiarização ao objetos, no grupo TS; os grupos SS e SI, exploraram os objetos em tempos semelhantes ao grupo TI, porém sem apresentar diferenças estatísticas entre o grupo TS. A sessão teste revelou que o grupo TS explorou de maneira semelhante os objetos novo e familiar, o que não foi observado nos demais grupos, indicando prejuízo na memória de reconhecimento no grupo TS ( $p<0,0001$ ; figura 8C); o tratamento com insulina evitou a ocorrência de déficit de memória no grupo TI.

Na habituação, observou-se hiperlocomoção no grupo TCE, comportamento que não comprometeu a realização do teste de reconhecimento de objetos, visto que os animais habituaram ao aparato e que a exploração de ambos os objetos na sessão de aquisição foi semelhante. Há um prejuízo na memória de reconhecimento no grupo TS que foi prevenido pela administração de insulina no grupo TI.

#### *Fatias hipocampais de animais TCE não são responsivas à insulina*

O imunconteúdo de proteínas da via de sinalização de insulina foram avaliadas no protocolo 2, para verificar se a adição de insulina ao meio foi capaz de ativar a cascata de sinalização desse hormônio.

A partir dessa sessão, os grupos experimentais serão indicados da seguinte forma “*TCE ou sham – meio de incubação*”.



Não observamos diferenças no conteúdo das proteínas pIRS1<sup>Ser612</sup> e IRS1 entre os grupos experimentais (figura 9A e 9B), porém a razão pIRS1<sup>Ser612</sup>/IRS1 está aumentada no grupo sham, na presença de insulina (grupos sham-normo insulina e sham-hiper insulina,  $p_{insulina}=0,016$ ). O mesmo não foi observado no grupo TCE em presença do hormônio (grupos TCE-normo insulina e TCE-hiper insulina) (figura 9C). Esses resultados indicam que as fatias do grupo TCE não foram responsivas à insulina.

Em relação ao conteúdo de pGSK3 $\beta$ <sup>Ser9</sup> e GSK3 $\beta$  e à razão pGSK3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>/GSK3 $\beta$  não houve diferença entre os grupos experimentais (figura 10), exceto pela diminuição dessa razão no grupo *sham-hiper em relação ao controle (sham-normo,  $p=0,016$ )*.

*TCE provoca prejuízos na resposta mitocondrial à substratos exógenos.*

Quando avaliamos a respiração mitocondrial basal, não há diferenças estatística entre os grupos (dados não mostrados), evidenciando que não existe alterações no metabolismo mitocondrial do grupo TCE quando comparado com o grupo sham, referente as condições basais e substratos endógenos. Porém, se observou mudanças importantes na atividade mitocondrial, quando as mitocôndrias foram desafiadas com substratos exógenos, com concentrações saturantes. Ao comparar o grupo sham com o TCE, em meio de incubação normo, observamos uma redução na respiração nos estados mitocondriais de OXPHOS (CI), máximo OXPHOS e OXPHOS (CII). A presença de insulina neste meio anulou essa diferença (figuras 11B, 11D e 11E). Quando as mitocôndrias foram submetidas ao meio de incubação hiper, não houve diferenças entre os grupos, independente da presença de insulina.

Ao comparamos a resposta dos animais sham nos diferentes meios, observamos redução na respiração do grupo hiper insulina em relação ao grupo normo, nos estados OXPHOS (CI+CII)

e máximo OXPHOS (figuras 11C e 11D), o que não ocorreu no grupo TCE. Mesmo com alterações na respiração mitocondrial, a produção de espécies reativas de oxigênio, analisadas pela produção de  $H_2O_2$ , não alterou durante todo o procedimento experimental (figura 12).

*Viabilidade celular não é alterada em 24 h pós trauma nem modificada pelos meios de incubação.*

Em 24 horas não há alteração na viabilidade celular no hipocampo de animais com TCE e a adição de glicose e insulina não modificou os resultados observados (figura 13).

## Discussão

O presente trabalho se propôs a investigar os efeitos da hiperglicemia e da administração de insulina em modelo animal de TCE moderado. Para tal, realizamos experimentos *in vivo*, no qual avaliamos tanto os efeitos periféricos quanto centrais, e *ex vivo* para avaliar, especificamente, os impactos à nível cerebral em parâmetros metabólicos e celulares.

Com objetivo de induzir um quadro de hiperglicemia, administramos STZ, droga utilizada também como ferramenta para o estudo animal de Diabete Melittus Tipo 1 (DM1).<sup>44-49</sup> Essa substância age seletivamente nas ilhotas  $\beta$  pancreáticas, destruindo-as e impossibilitando a produção de novas moléculas de insulina. Como efeito, os animais apresentam deficiência de insulina, hiperglicemia, polidipsia e poliúria.<sup>37</sup>

Dentro do contexto do TCE, sabe-se que a hiperglicemia transitória é um fator determinante para o desfecho clínico dos pacientes. Estudos epidemiológicos com pacientes diabéticos afirmam que a mortalidade pós-TCE é maior nos pacientes que não fazem o uso de insulina regularmente, submetendo o organismo a períodos de hiperglicemia; e que o prognóstico de indivíduos diabéticos, que sofrem um evento de TCE, é pior naqueles que são insulino-dependentes<sup>19</sup>. Desta forma, propomos um modelo animal de hiperglicemia seguido pelo tratamento com insulina, para avaliar os efeitos do controle glicêmico na recuperação pós-TCE. Para escolha da dose ideal para o tratamento dos camundongos hiperglicêmicos, realizamos curvas de dose-tempo com doses de insulina de 5, 10 e 20 U/kg.

A insulina glargina (LANTUS<sup>®</sup>) é um análogo à insulina humana que apresenta ação prolongada e liberação lenta, evitando a ocorrência de episódios de hipoglicemia.<sup>50</sup> Com os resultados da curva dose-tempo de insulina observou-se que a administração desse hormônio na dose de

20 U/Kg foi capaz de reduzir e manter os níveis de glicose controlados por até 6 horas após a injeção, sem ocorrência de episódios de hipoglicemia, indicando a eficiência dessa dose no tratamento da hiperglicemia em nosso modelo animal. Para camundongos, valores glicêmicos, em jejum, maiores que 200 mg/dl são considerados hiperglicemia, ao passo que valores menores de 50 mg/dl são ditos de hipoglicemia.<sup>50</sup>

Os camundongos hiperglicêmicos receberam tratamento diário com insulina ou salina, iniciado 6 dias antes da indução do TCE. A redução da glicemia casual no grupo TI comparado ao grupo TS, no momento da cirurgia, evidencia o desempenho do tratamento com o hormônio insulina na redução da glicose sanguínea, embora não tenha sido evidenciada diferença entre os grupos sham tratados ou não com insulina. A curva de dose-tempo foi realizada no estado de jejum dos animais, sem considerar a glicemia casual, que é dependente, principalmente da ingestão de alimentos. A obtenção desses dados, então, é bastante plausível, visto que não se fez a retirada do alimento da caixa-moradia anteriormente a cirurgia.

Neste estudo, avaliamos o efeito do TCE na atividade locomotora e memória de reconhecimento. A análise de locomoção foi realizada nas sessões de habituação ao aparato do teste de RO, para verificar se os animais não apresentavam prejuízos na atividade locomotora espontânea, o que poderia interferir na realização da atividade comportamental seguinte. Observamos um aumento na distância percorrida e velocidade média dos animais TCE, 6 e 7 dias após a indução do trauma, caracterizando um comportamento de hiperlocomoção. Viggiano (2008), em sua revisão, aponta que lesões que afetam o bulbo olfatório, córtex frontoparietal, hipocampo, estriado, amígdala, substância negra, cerebelo e destroem a rede de comunicação entre essas regiões cerebrais, aumentam a atividade locomotora dos animais.<sup>51</sup> É sabida a existência de lesão no córtex causada pelo TCE tendo em vista as alterações na atividade e na morfologia

neuronal no córtex advindas do impacto.<sup>52,53</sup> No estudo de Budinich e colaboradores (2013), a atividade hiperlocomotora pode ser observada em 1, 7 e 14 dias pós-TCE, em modelos de ICC<sup>54</sup>, indicando que a lesão cortical decorrente do ICC está relacionada com o comportamento de hiperlocomção. Modelos de TCE por concussão (*Closed head injury*) também evidenciam a presença de hiperlocomção, observada em até 10 dias após o trauma.<sup>55</sup>

A atividade de reconhecimento de objetos é baseada na tendência inata dos roedores em explorar mais a novidade. Contudo, é necessário que os animais estejam familiarizados com o ambiente, para que os objetos sejam a única novidade, direcionando assim, a exploração para o novo.<sup>42</sup> Em face aos nossos dados, observamos que, embora os animais TCE apresentaram comportamento de hiperlocomção em ambas as sessões de habituação, o processo de ambientação ao aparato ocorreu tanto nos animais sham quanto nos TCE, dado pela redução da média da distância percorrida e pela diminuição da locomoção nos minutos finais da sessão.

Na sessão de aquisição do teste de RO, observamos que a exploração de ambos os objetos foi realizada de forma semelhante por todos os grupos. Porém, o grupo TS permaneceu mais tempo explorando os objetos, indicando que esses animais tiveram mais tempo para o reconhecimento e aquisição da memória em relação ao objetos e, possivelmente, maior familiarização à eles. Na sessão teste, somente o grupos TS não explorou mais o objeto novo, indicando que esses animais apresentam prejuízo na memória de reconhecimento, resultado que não é devido à baixa exploração dos objetos na fase de aquisição. Contudo, animais TI reconheceram o novo, evidenciando que o tratamento com insulina preveniu o déficit de memória desencadeado pelo TCE. Estudos que avaliam a memória de reconhecimento pós-TCE são múltiplos para modelos de ICC ou concussão (*Closed head injury*), em ratos Sprague Dawley ou camundongos Swiss, sendo escassos os estudos com a espécie C57BL6. Esses estudos destacam que o prejuízo na

memória de reconhecimento pode ser visualizada em 24 horas, 7 dias e em até 30 dias após o TCE.<sup>56-60</sup> Modelos de lesão traumática moderada por percussão de fluidos, em animais C57BL6, levam ao prejuízo na memória de reconhecimento 9 e 16 dias após o TCE, bem como as concussões, no qual o prejuízo cognitivo é observado 24 horas após a lesão e persiste por 7 dias.<sup>52,61</sup> Nos roedores, os processos de familiarização e reconhecimento estão associados com a função das estruturas do Lobo Temporal Medial, que incluem o hipocampo, amígdala e os córtex perirrinal, entorrinal e para-hipocampal.<sup>62</sup> O hipocampo tem papel central na conexão entre essas estruturas e sua contribuição para a detecção da ‘novidade’ tem sido relatado em inúmeros estudos<sup>63-65</sup> e lesões hipocampais estão associadas com dano na memória de reconhecimento.<sup>66-68</sup> As lesões de ICC promovem danos no hipocampo, sejam eles pelo impacto direto (lesão primária, em casos de TCE grave) ou pelas alterações celulares que se seguem pós-impacto, sendo confirmado pela observação de déficits na memória espacial, cuja consolidação é fortemente dependente da atividade hipocampal.<sup>69</sup> Em nosso trabalho mostramos que o tratamento regular com insulina preveniu o déficit de memória desencadeado pelo TCE.

Há uma forte correlação entre o tratamento com insulina e melhora cognitiva tanto em pacientes como em modelos experimentais.<sup>33,70,71</sup> No cérebro, a insulina modula a utilização de glicose no hipocampo e facilita a consolidação do processo de memória.<sup>34,72,73</sup> A redução nos níveis e na atividade de insulina no cérebro está associada com o desenvolvimento da Doença de Alzheimer (DA), patologia caracterizada inicialmente pelo prejuízo de memória. Visto que a sinalização de insulina no SNC é extremamente importante para a formação e manutenção das memórias, o tratamento crônico com insulina periférica pode ser o efector da melhora cognitiva, observada neste estudo, nos animais do grupo TI.

Pacientes que desenvolvem hiperglicemia recebem insulina nas primeiras 24 horas após o TCE.<sup>8</sup> Assim, a melhora no prognóstico clínico observada com administração de insulina pode estar associada com os efeitos agudos desse hormônio. Em virtude dos achados anteriores, um segundo protocolo foi elaborado, tendo objetivo de avaliar os efeitos agudos da insulina no SNC pós-TCE que poderiam estar relacionados com a melhora cognitiva observada nos animais a longo prazo. Utilizamos animais TCE e sham, e realizamos ensaios *ex vivo*, em fatias hipocâmpais. A escolha dessa estrutura se deu pela importância da mesma para atividades que envolvem memória, onde observamos efeito positivo da insulina no TCE. Avaliamos o efeito do hormônio sob aspectos de viabilidade, metabolismo celular e ativação da via de sinalização de insulina.

Verificamos o imunocontéudo das proteínas IRS-1 e GSK3 $\beta$  e suas fosforilações em serina 612 e 9, respectivamente, por serem proteínas importantes na via. Observamos um aumento da razão pIRS-1<sup>Ser612</sup>/IRS-1, na presença de insulina somente no grupo sham. Já a razão GSK3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>/GSK3 $\beta$  não apresentou alterações na presença do hormônio, tanto no grupo sham como no TCE. A sinalização de insulina no hipocampo ocorre de forma semelhante ao observado em tecidos periféricos. A insulina liga-se ao seu receptor (IR), promovendo autofosforilação seguido pelo recrutamento e fosforilação do resíduo tirosina da proteína IRS-1, levando a ativação de uma cascata de proteínas (PI3K – PDK1 – AKT), que culmina com a translocação do transportador de glicose (GLUT) para a membrana e fosforilação (Ser<sup>9</sup>) e inativação da GSK3 $\beta$ <sup>30,74</sup>. A ativação sustentada do IR, em casos de hiperinsulinemia, como no Diabete Mellitus tipo 2, pode resultar na fosforilação dos resíduos de serina do IRS-1 e levar a atenuação da transmissão do sinal de insulina.<sup>75</sup> O acionamento constitutivo do substrato IRS-1 em tirosina promove o crescimento celular sustentado e está associado com o desenvolvimento de tumo-

res.<sup>76</sup> Dessa forma, em condições fisiológicas, a fosforilação em serina é essencial para o feedback negativo da via, bloqueando a ativação constitutiva do IRS-1.<sup>77-79</sup> Nossos resultados mostram que animais sham são responsivos a insulina do meio, visto pelo aumento da razão pIRS-1<sup>Ser612</sup>/IRS-1, que está associado com a ocorrência de feedback negativo da via. Esses achados evidenciam a integridade da via de sinalização de insulina nesse grupo, uma vez que a dose de insulina adicionada ao meio é supra-fisiológica, caracterizando um quadro de hiperinsulinemia.<sup>80</sup> Uma vez que há um bloqueio da via, é coerente que a razão pGSK3 $\beta$ <sup>Ser9</sup>/GSK3 $\beta$ , esteja inalterada nesse grupo. Em relação ao grupo TCE, observamos que o mecanismo de feedback negativo não foi acionado, possivelmente por uma falha na via de sinalização de insulina, fato este que pode estar associado à resistência cerebral à insulina observada no TCE. Porém é necessário a imunocuantificação de demais proteínas da via para que possamos confirmar nossa hipótese.

Sabe-se que a homeostase mitocondrial encontra-se alterada pós-TCE<sup>81</sup> e nosso estudo evidenciou um prejuízo na atividade mitocondrial em fatias hipocâmpais dos animais TCE. O consumo de oxigênio basal, que corresponde ao metabolismo mitocondrial intrínseco ao grupo, não apresentou diferenças entre os grupos sham e TCE, evidenciando que, referente ao consumo de oxigênio dependente de substratos endógenos, as diferenças na função mitocondrial são indetectáveis 24 horas após o TCE. Porém, quando a mitocôndria é submetida aos desafios impostos pela adição de substratos e inibidores em condições saturantes, no qual se avalia diferentes aspectos do sistema de transporte de elétrons, observou-se uma resposta diminuída nos estados mitocondriais de OXPHOS (CI), máximo OXPHOS e OXPHOS (CII). Dessa forma, nota-se que as fatias hipocâmpais são pouco responsivas ao acréscimo de ADP, efeito essa que pode estar associada com dano na ATP-sintase, complexo responsável pela transformação de ADP



em ATP. Dessa forma, podemos inferir que a capacidade máxima de produção de ATP é comprometido após o TCE, o que pode estar relacionada especificamente ao funcionamento da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Sintase. A redução nos níveis de ATP, dentro de 24 h pós-TCE, é observada em córtex e hipocampo em modelos de ICC e *close head injury*<sup>82</sup> e, de acordo com Arun e colaboradores (2010), os níveis de ATP encontram-se diminuídos em até 6 dias após a lesão.<sup>83</sup> Alterações no acoplamento respiratório mitocondrial são evidentes nas fases agudas do TCE<sup>84</sup>, advindo das lesões secundárias, e podem persistir ao longo do tempo, como evidenciado por Xi-ong e colaboradores (1997), em que confirma-se a presença de alterações no consumo de oxigênio no estado correspondente ao OXPHOS (CI +CII) entre 24 e 48 h e 7 e 14 dias pós ICC.<sup>10</sup> Embora esse último estudo avalie respostas mitocondriais no córtex, há outros que confirmam o perfil de alterações também no hipocampo.<sup>85,86</sup>

Verificamos que o consumo mitocondrial de oxigênio basal não é alterado após o TCE, embora o consumo relacionado a síntese de ATP esteja comprometido, conforme observado nos estados relacionados a fosforilação com concentrações saturantes de ADP. Assim, nossos dados complementam a literatura evidenciando a presença de dano mitocondrial no hipocampo 24 h após o TCE, e levantam a hipótese de que, embora não tenhamos observado diferenças na produção de peróxido de hidrogênio, a dinâmica do potencial de membrana mitocondrial pode estar comprometida uma vez que a formação e manutenção desse potencial é fundamental para o fenômeno de fosforilação oxidativa na conversão de ADP em ATP pela ATP-sintase.<sup>87</sup>

Os nossos dados indicam que a presença de insulina no meio de incubação anulou as diferenças existentes entre animais sham e TCE. No cérebro, a insulina apresenta efeitos importantes na regulação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e manutenção do potencial de membrana, além de promover o aumento da síntese de ATP e consumo de oxigênio pela mitocôndria, em modelos animais de

hiperglicemia.<sup>36,87-89</sup> Os estudos em tecido cerebral são limitados e a função da integridade da sinalização de insulina no cérebro e sua ação na mitocôndria permanecem incertos, porém há fortes evidências de que a integridade da via é importante e necessária para a funcionalidade mitocondrial.<sup>90</sup> Nossos resultados não evidenciaram alteração na produção de  $H_2O_2$ , contrariando a literatura, embora esses resultados sejam preliminares e serão aprimorados para garantir maior robustez dos dados. Porém, torna-se imprescindível avaliar o efeito da insulina no potencial de membrana mitocondrial, uma vez que ele é importante para a dinâmica da mitocôndria e pode sofrer influências da sinalização de insulina.

Acredita-se que a disfunção mitocondrial seja um dos gatilhos para a ocorrência de lesões e morte celular no TCE e para a inicialização dos processos de neurodegeneração.<sup>57</sup> No entanto, em nosso estudo, mostramos que não há diferenças na viabilidade celular, no hipocampo, em 24 h pós-TCE. A análise de viabilidade celular pela técnica de MTT, em modelos de TCE, é bastante limitado na literatura. Moojen e colaboradores (2012) utilizaram esse protocolo em fatias de córtex e hipocampo para avaliação da viabilidade celular 96 h após indução de concussão, observando uma redução na viabilidade no grupo TCE somente no hipocampo.<sup>60</sup> No entanto, sabe-se que em 24 horas após o trauma há aumento de células em processo de degeneração e apoptose, tanto no hipocampo quanto no córtex, visto por técnicas de iodeto de propídio e FluoroJade, contrastando com nossos resultados.<sup>91-93</sup> Porém, o ensaio de MTT baseia-se na redução do composto à formazan, via atividade desidrogenases presentes na célula. Uma fração de MTT é reduzida na mitocôndria, sendo que a maioria do formazan é produzido por desidrogenases presentes em outros compartimentos celulares, como no citoplasma e membranas plasmáticas<sup>94</sup>, embora essa constatação não diminua a importância da mitocôndria para os resultados da técnica.<sup>95</sup>

Nossos resultados evidenciam um efeito prejudicial da hiperglicemia no TCE, dado pelo aumento na mortalidade e déficit na memória de reconhecimento. Animais hiperglicêmicos que são tratados com insulina, apresentam prevenção desses parâmetros, dados esses que corroboram com a literatura. Agudamente, observamos que fatias hipocâmpais de animais sham são responsivos a insulina, confirmando a integridade da via de sinalização do hormônio, contrário ao observado no grupo TCE, no qual não houve acionamento do feedback negativo da via. O consumo mitocondrial de oxigênio basal e a viabilidade celular, no hipocampo, não são alterados 24 horas após o TCE. Porém evidencia-se a presença de déficit mitocondrial nesse grupo, quando comparado ao grupo sham, dado pela redução do consumo de oxigênio em resposta à adição de ADP em condições saturantes; a presença de insulina anulou essas diferenças. Esses achados ressaltam a importância da insulina e do controle glicêmico na prevenção dos efeitos deletérios desencadeados pelo TCE.

**Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

**Declaração de divulgação do autor**

Não existem conflitos de interesse.

## Referências

1. Peeters, W., van den Brande, R., Polinder, S., Brazinova, A., Steyerberg, E.W., Lingsma, H.F., and Maas, A.I.R. (2015). Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir. (Wien)*. 157, 1683–1696.
2. De Almeida, C.E.R., De Sousa Filho, J.L., Dourado, J.C., Gontijo, P.A.M., Dellaretti, M.A., and Costa, B.S. (2016). Traumatic Brain Injury Epidemiology in Brazil. *World Neurosurg.* 87, 540–547.
3. Frieden, T.R., Houry, D., and Baldwin, G. (2015). Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation. *Centers Dis. Control Prev. Natl. Cent. Inj. Prev. Control Div. Unintentional Inj. Prev.* , 1–74.
4. Menon, D.K., Schwab, K., Wright, D.W., and Maas, A.I. (2010). Position Statement : Definition of Traumatic Brain Injury. *Arch Phys Med Rehabil* 91, 1637–1640.
5. Blennow, K., Hardy, J., and Zetterberg, H. (2012). The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron* 76, 886–899.
6. Andriessen, T.M.J.C., Jacobs, B., and Vos, P.E. (2010). Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2381–2392.
7. Kinoshita, K. (2016). Traumatic brain injury: Pathophysiology for neurocritical care. *J. Intensive Care* 4, 1–10.
8. Himuro, H.S., Cordeiro, V., Enrique, L., and Amaya, C. (2011). Conduitas no paciente com trauma crânioencefálico. *Rev Bras Clin Med* 9, 74–82.
9. Zeng, X.J., Li, P., Ning, Y.L., Zhao, Y., Peng, Y., Yang, N., Zhao, Z.A., Chen, J.F., and Zhou, Y.G. (2018). Impaired autophagic flux is associated with the severity of trauma and the role of A2AR in brain cells after traumatic brain injury. *Cell Death Dis.* 9, 252.
10. XIONG, Y., GU, Q., PETERSON, P.L., MUIZELAAR, J.P., and LEE, C.P. (1997). Mitochondrial Dysfunction and Calcium Perturbation Induced by Traumatic Brain Injury. *J. Neurotrauma* 14, 23–34.
11. Hiebert, J.B., Shen, Q., Thimmesch, A.R., and Pierce, J.D. (2015). Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. *Am. J. Med. Sci.* 350, 132–138.
12. Luo, C.L., Li, B.X., Li, Q.Q., Chen, X.P., Sun, Y.X., Bao, H.J., Dai, D.K., Shen, Y.W., Xu, H.F., Ni, H., Wan, L., Qin, Z.H., Tao, L.Y., and Zhao, Z.Q. (2011). Autophagy is involved in traumatic brain injury-induced cell death and contributes to functional outcome deficits in mice. *Neuroscience* 184, 54–63.
13. Werner, C., and Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br. J. Anaesth.* 99, 4–9.
14. Melo, J.R.T., Di Rocco, F., Blanot, S., Laurent-Vannier, A., Reis, R.C., Baugnon, T., Sainte-Rose, C., Oliveira-Filho, J., Zerah, M., and Meyer, P. (2010). Acute hyperglycemia is a reliable outcome predictor in children with severe traumatic brain injury. *Neurosurgery* 152, 1559–1565.
15. Bosarge, P.L., Shoultz, T.H., Griffin, R.L., and Kerby, J.D. (2015). Stress-induced

- hyperglycemia is associated with higher mortality in severe traumatic brain injury. *J. Trauma Acute Care Surg.* 79, 289–94.
16. Fu, Y.-Q., Chong, S.-L., Lee, J.H., Liu, C.-J., Fu, S., Loh, T.F., Ng, K.C., and Xu, F. (2017). The impact of early hyperglycaemia on children with traumatic brain injury. *Brain Inj.* 31, 396–400.
  17. Young, A.M.H., Adams, H., Donnelly, J., Guilfoyle, M.R., Fernandes, H., Garnett, M.R., Czosnyka, M., Smielewski, P., Plummer, M., Agrawal, S., and Hutchinson, P.J. (2017). Glycemia Is Related to Impaired Cerebrovascular Autoregulation after Severe Pediatric Traumatic Brain Injury: A Retrospective Observational Study. *Front. Pediatr.* 5, 1–7.
  18. Saadat, S.M.S., Bidabadi, E., Saadat, S.N.S., Mashouf, M., Salamat, F., and Yousefzadeh, S. (2012). Association of persistent hyperglycemia with outcome of severe traumatic brain injury in pediatric population. *Child's Nerv. Syst.* 28, 1773–1777.
  19. Ley, E.J., Srour, M.K., Clond, M.A., Barnajian, M., Tillou, A., Mirocha, J., and Salim, A. (2011). Diabetic Patients With Traumatic Brain Injury: Insulin Deficiency Is Associated With Increased Mortality. *J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care* 70, 1141–1144.
  20. Chong, S.L., Harjanto, S., Testoni, D., Ng, Z.M., Low, C.Y.D., Lee, K.P., and Lee, J.H. (2015). Early hyperglycemia in pediatric traumatic brain injury predicts for mortality, prolonged duration of mechanical ventilation, and intensive care stay. *Int. J. Endocrinol.* 2015, 1-8.
  21. Tomlinson, D.R., and Gardiner, N.J. (2008). Glucose neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 36–45.
  22. Azevedo, J.R.A. de, Lima, E.R.M., Cossetti, R.J.D., Azevedo, R.P. de, De Azevedo, J.R.A., Lima, E.R.M., Cossetti, R.J.D., and De Azevedo, R.P. (2007). Intensive insulin therapy versus conventional glycemic control in patients with acute neurological injury: A prospective controlled trial. *Arq. Neuropsiquiatr.* 65, 733–738.
  23. Vogelzang, M., Loef, B.G., Regtien, J.G., Van Der Horst, I.C.C., Van Assen, H., Zijlstra, F., and Nijsten, M.W.N. (2008). Computer-assisted glucose control in critically ill patients. *Intensive Care Med.* 34, 1421–1427.
  24. Griesdale, D.E.G., de Souza, R.J., van Dam, R.M., Heyland, D.K., Cook, D.J., Malhotra, A., Dhaliwal, R., Henderson, W.R., Chittock, D.R., Finfer, S., and Talmor, D. (2009). Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *Can. Med. Assoc.* 180, 821–7.
  25. Rovlias, A., and Kotsou, S. (2000). The Influence of Hyperglycemia on Neurological Outcome in Patients with Severe Head Injury 46, 335-342.
  26. Clayton, T.J., Nelson, R.J., and Manara, A.R. (2004). Reduction in mortality from severe head injury following introduction of a protocol for intensive care management. *Br. J. Anaesth.* 93, 761–767.
  27. Chapman, I., Goble, E., Wittert, G., Morley, J., and Horowitz, M. (1998). Effect of intravenous glucose and euglycemic insulin infusions on short-term appetite and food intake. *Physiology* 34, 596–603.
  28. Baskin, D.G., Figlewicz Lattemann, D., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., and

- Schwartz, M.W. (1999). Insulin and leptin: Dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* 848, 114–123.
29. Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte Jr, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282, 503.
  30. Plum, L., Schubert, M., and Brüning, J.C. (2005). The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 59–65.
  31. Shemer, J., Adamo, M., K. Raizada, M., Heffez, D., Zick, Y., and LeRoit, D. (1987). Insulin and IGF-I Stimulate Phosphorylation of Their Respective Receptors in Intact Neuronal and Glial Cells in Primary Culture. *J. Mol. Neuroscience* 69, 87–96.
  32. Dou, J.T., Chen, M., Dufour, F., Alkon, D.L., and Zhao, W.Q. (2005). Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn. Mem.* 12, 646.
  33. Benedict, C., Hallschmid, M., Schultes, B., Born, J., and Kern, W. (2007). Intranasal insulin to improve memory function in humans. *Neuroendocrinology* 86, 136–142.
  34. Freiherr, J., Hallschmid, M., Frey, W.H., Brünner, Y.F., Chapman, C.D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F.G., and Benedict, C. (2013). Intranasal insulin as a treatment for alzheimer's disease: A review of basic research and clinical evidence. *CNS Drugs* 27, 505–514.
  35. Blázquez, E., Velázquez, E., Hurtado-Carneiro, V., and Ruiz-Albusac, J.M. (2014). Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer's disease. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 5, 1–21.
  36. Muller, A.P., Haas, C.B., Camacho-Pereira, J., Brochier, A.W., Gnoatto, J., Zimmer, E.R., de Souza, D.O., Galina, A., and Portela, L.V. (2013). Insulin prevents mitochondrial generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat brain. *Exp. Neurol.* 247, 66–72.
  37. Furman, B.L. (2015). Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* 70:5.47, 1-20.
  38. Muller, A.P., Gnoatto, J., Moreira, J.D., Zimmer, E.R., Haas, C.B., Lulhier, F., Perry, M.L.S., Souza, D.O., Torres-Aleman, I., and Portela, L. V. (2011). Exercise increases insulin signaling in the hippocampus: Physiological effects and pharmacological impact of intracerebroventricular insulin administration in mice. *Hippocampus* 21, 1082–1092.
  39. Smith, D.H., Soares, H.D., Pierce, J.S., Perlman, K.G., Saatman, K.E., Meaney, D.F., Dixon, C.E., and McIntosh, T.K. (1995). A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J. Neurotrauma* 12, 169–178.
  40. Romine, J., Gao, X., and Chen, J. (2014). Controlled Cortical Impact Model for Traumatic Brain Injury. *J. Vis. Exp.* 90, 13–16.
  41. Lueptow, L.M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *J. Vis. Exp.* 126, 1–9.
  42. Leger, M., Quiedeville, A., Bouet, V., Haelewyn, B., Boulouard, M., Schumann-Bard,

- P., and Freret, T. (2013). Object recognition test in mice. *Nat. Protoc.* 8, 2531–2537.
43. Gnaiger, E. (2014). Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis The Blue Book Mitochondrial Pathways and Respiratory Control An Introduction to OXPHOS Analysis.
  44. Kanigur-Sultuybek, G., Guven, M., Onaran, I., Tezcan, V., Cenani, A., and Hatemi, H. (1995). The effect of metformin on insulin receptors and lipid peroxidation in alloxan and streptozotocin induced diabetes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 6, 271–280.
  45. Pietropaolo, M. (2018). Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Acta Naturae* 10, 17–19.
  46. Da Rosa, L.C., Chiuso-Minicucci, F., Zorzella-Pezavento, S.F.G., França, T.G.D., Ishikawa, L.L.W., Colavite, P.M., Balbino, B., Tavares, L.C.B., Silva, C.L., Marques, C., Ikoma, M.R. V, and Sartori, A. (2013). Bacille Calmette-Guérin/DNAhsp65 prime-boost is protective against diabetes in non-obese diabetic mice but not in the streptozotocin model of type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 430–437.
  47. Acharjee, S., Ghosh, B., Al-Dhubiab, B.E., and Nair, A.B. (2013). Understanding type 1 diabetes: Etiology and models. *Can. J. Diabetes* 37, 269–276.
  48. Rabinowitz, J.L., and Craig, R.G. (1989). Changes in whole body lipid composition in a murine model of insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 38, 777–780.
  49. Rivoira, M., Rodríguez, V., Picotto, G., Battaglino, R., and Tolosa de Talamoni, N. (2018). Naringin prevents bone loss in a rat model of type 1 Diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* 637, 56–63.
  50. Grant, C.W., Duclos, S.K., Moran-Paul, C.M., Yahalom, B., Tirabassi, R.S., Arreaza-Rubin, G., Spain, L.M., and Guberski, D.L. (2012). Development of standardized insulin treatment protocols for spontaneous rodent models of type 1 diabetes. *Comp. Med.* 62, 381–390.
  51. Viggiano, D. (2008). The hyperactive syndrome: Metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav. Brain Res.* 194, 1–14.
  52. Ouyang, W., Yan, Q., Zhang, Y., and Fan, Z. (2017). Moderate injury in motor-sensory cortex causes behavioral deficits accompanied by electrophysiological changes in mice adulthood. *PLoS One* 12, 1–20.
  53. Ping, X., and Jin, X. (2016). Transition from Initial Hypoactivity to Hyperactivity in Cortical Layer V Pyramidal Neurons after Traumatic Brain Injury *In Vivo*. *J. Neurotrauma* 33, 354–361.
  54. Budinich, C.S., Tucker, L.B., Lowe, D., Rosenberger, J.G., and McCabe, J.T. (2013). Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 108, 66–73.
  55. Schwarzbald, M.L., Rial, D., De Bem, T., Machado, D.G., Cunha, M.P., dos Santos, A.A., dos Santos, D.B., Figueiredo, C.P., Farina, M., Goldfeder, E.M., Rodrigues, A.L.S., Prediger, R.D.S., and Walz, R. (2010). Effects of Traumatic Brain Injury of Different Severities on Emotional, Cognitive, and Oxidative Stress-Related Parameters in Mice. *J. Neurotrauma* 27, 1883–1893.



56. Eakin, K., Baratz-Goldstein, R., Pick, C.G., Zindel, O., Balaban, C.D., Hoffer, M.E., Lockwood, M., Miller, J., and Hoffer, B.J. (2014). Efficacy of N-acetyl cysteine in traumatic brain injury. *PLoS One* 9, 1–7.
57. Chen, H., Chan, Y.L., Nguyen, L.T., Mao, Y., de Rosa, A., Beh, I.T., Chee, C., Oliver, B., Herok, G., Saad, S., and Gorrie, C. (2016). Moderate traumatic brain injury is linked to acute behaviour deficits and long term mitochondrial alterations. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43, 1107–1114.
58. Ji, X., Peng, D., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, Y., Gao, Y., Lu, N., and Tang, P. (2017). Astaxanthin improves cognitive performance in mice following mild traumatic brain injury. *Brain Res.* 1659, 88–95.
59. Zhao, J., Hylin, M.J., Kobori, N., Hood, K.N., Moore, A.N., and Dash, P.K. (2017). Post-injury administration of galantamine reduces traumatic brain injury pathology and improves outcome. *J. Neurotrauma*, 35, 362-374.
60. Moojen, V.K.M., Damiani-Neves, M., Bavaresco, D. V., Pescador, B.B., Comim, C.M., Quevedo, J., and Boeck, C.R. (2012). NMDA preconditioning prevents object recognition memory impairment and increases brain viability in mice exposed to traumatic brain injury. *Brain Res.* 1466, 82–90.
61. Yang, S.H., Gustafson, J., Gangidine, M., Stepien, D., Schuster, R., Pritts, T.A., Goodman, M.D., Remick, D.G., and Lentsch, A.B. (2015). A Murine Model of Mild Traumatic Brain Injury Exhibiting Cognitive and Motor Deficits. *J. Surg. Res.* 6, 790–795.
62. Kafkas, A., and Montaldi, D. (2018). How do memory systems detect and respond to novelty? *Neurosci. Lett.* 680, 60–68.
63. Bird, C.M. (2017). The role of the hippocampus in recognition memory. *Cortex* 93, 155–165.
64. Warburton, E.C., and Brown, M.W. (2015). Neural circuitry for rat recognition memory. *Behav. Brain Res.* 285, 131–139.
65. Daselaar, S.M. (2006). Triple Dissociation in the Medial Temporal Lobes: Recollection, Familiarity, and Novelty. *J. Neurophysiol.* 96, 1902–1911.
66. Clark, R.E., West, A.N., Zola, S.M., and Squire, L.R. (2001). Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching-to-sample task. *Hippocampus* 11, 176–186.
67. Cohen, S.J., Munchow, A.H., Rios, L.M., Zhang, G., Ásgeirsdóttir, H.N., and Stackman, R.W. (2013). The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Curr. Biol.* 23, 1685–1690.
68. Suzuki, M., Johnson, J.D., and Rugg, M.D. (2011). Recollection-related hippocampal activity during continuous recognition: A high-resolution fMRI study. *Hippocampus* 21, 575–583.
69. Adelson, P.D., Fellows-Mayle, W., Kochanek, P.M., and Dixon, C.E. (2013). Morris water maze function and histologic characterization of two age-at-injury experimental models of controlled cortical impact in the immature rat. *Child’s Nerv. Syst.* 29, 43–53.
70. Biessels, G.J., Kamal, A., Urban, I.J.A., Spruijt, B.M., Erkelens, D.W., and Gispen,

- W.H. (1998). Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Effects of insulin treatment. *Brain Res.* 800, 125–135.
71. Craft, S., Baker, L.D., Montine, T.J., Minoshima, S., Watson, G.S., Claxton, A., Arbuckle, M., Callaghan, M., Tsai, E., Plymate, S.R., Green, P.S., Leverenz, J., Cross, D., and Gerton, B. (2012). Intranasal insulin therapy for Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment: A pilot clinical trial. *Arch. Neurol.* 69, 29–38.
  72. Park, C.. (2001). Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25, 311–323.
  73. Ferrario, C.R., and Reagan, L.P. (2017). Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology* 136, 182–191.
  74. Biessels, G.J., and Reagan, L.P. (2015). Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 660–671.
  75. Stanley, M., Macauley, S.L., and Holtzman, D.M. (2016). Changes in insulin and insulin signaling in Alzheimer’s disease: cause or consequence? *J. Exp. Med.* 213, 1375–1385.
  76. Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J.F. (2005). Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99–109.
  77. De Fea, K., and Roth, R.A. (1997). Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36, 12939–12947.
  78. Mothe, I., and Van Obberghen, E. (1996). Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. *J. Biol. Chem.* 271, 11222–11227.
  79. Li, Y., Eitan, S., Wu, J., Evans, C.J., Kieffer, B., Sun, X., and Polakiewicz, R.D. (2003). Morphine induces desensitization of insulin receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6255–6266.
  80. Talbot, K., Wang, H., Kazi, H., Han, L., Bakshi, K.P., Stucky, A., Fuino, R.L., Kawaguchi, K.R., Samoyedny, A.J., Wilson, R.S., Arvanitakis, Z., Schneider, J. a, Wolf, B. a, Bennett, D. a, Trojanowski, J.Q., and Arnold, S.E. (2012). Demonstrated brain insulin resistance in alzheimer’s disease patients is associated with IGF-1 resistance, IRS-1 dysregulation, and cognitive decline. *J. Clin. Invest.* 122, 1316–1338.
  81. Sullivan, P.G., Thompson, M.B., and Scheff, S.W. (1999). Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp. Neurol.* 160, 226–234.
  82. Lifshitz, J., Friberg, H., Neumar, R.W., Raghupathi, R., Welsh, F.A., Janmey, P., Saatman, K.E., Wieloch, T., Grady, M.S., and McIntosh, T.K. (2003). Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: Evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 219–231.
  83. Arun, P., Ariyannur, P.S., Moffett, J.R., Xing, G., Hamilton, K., Grunberg, N.E., Ives, J.A., and Namboodiri, A.M.A. (2010). Metabolic acetate therapy for the treatment of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 27, 293–8.

84. Morey, J.N., Boggero, I.A., Scott, A.B., and Segerstrom, S.C. (2015). Mitochondrial bioenergetic alterations after focal traumatic brain injury in the immature brain. *Exp. Neurol.* , 13–17.
85. Singh, I.N., Sullivan, P.G., Deng, Y., Mbye, L.H., and Hall, E.D. (2006). Time course of post-traumatic mitochondrial oxidative damage and dysfunction in a mouse model of focal traumatic brain injury: Implications for neuroprotective therapy. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 26, 1407–1418.
86. Hubbard, W.B., Harwood, C.L., Geisler, J.G., Vekaria, H.J., and Sullivan, P.G. (2018). Mitochondrial uncoupling prodrug improves tissue sparing, cognitive outcome, and mitochondrial bioenergetics after traumatic brain injury in male mice. *J. Neurosci. Res.* 96, 1677–1688.
87. Moreira, P.I., Santos, M.S., Sena, C., Seica, R., and Oliveira, C.R. (2005). Insulin protects against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. *Neurobiol. Dis.* 18, 628–637.
88. Cardoso, S., Santos, R.X., Correia, S.C., Carvalho, C., Santos, M.S., Baldeiras, I., Oliveira, C.R., and Moreira, P.I. (2013). Insulin-induced recurrent hypoglycemia exacerbates diabetic brain mitochondrial dysfunction and oxidative imbalance. *Neurobiol. Dis.* 49, 1–12.
89. Moreira, P., Rolo, A., Sena, C., Seica, R., Oliveira, C., and Santos, M. (2006). Insulin Attenuates Diabetes-Related Mitochondrial Alterations: A Comparative Study. *Med. Chem. (Los. Angeles)*. 2, 299–308.
90. Rajala, R. V, Rajala, A., and Gupta, V.K. (2010). Insulin Receptor Signaling Regulates Mitochondrial Integrity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1105.
91. Lee, S.H., Choi, B.Y., Lee, S.H., Kho, A.R., Jeong, J.H., Hong, D.K., and Suh, S.W. (2017). Administration of protocatechuic acid reduces traumatic brain injury-induced neuronal death. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2510.
92. Zhang, M., Shan, H., Chang, P., Wang, T., Dong, W., Chen, X., and Tao, L. (2014). Hydrogen sulfide offers neuroprotection on traumatic brain injury in parallel with reduced apoptosis and autophagy in mice. *PLoS One*, 9, e87241
93. Wang, Y.Q., Wang, L., Zhang, M.Y., Wang, T., Bao, H.J., Liu, W.L., Dai, D.K., Zhang, L., Chang, P., Dong, W.W., Chen, X.P., and Tao, L.Y. (2012). Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model. *Neurochem. Res.* 37, 1849–1858.
94. Bernas, T., and Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry* 47, 236–242.
95. Surin, A.M., Sharipov, R.R., Krasil'nikova, I.A., Boyarkin, D.P., Lisina, O.Y., Gorbacheva, L.R., Avetisyan, A. V, and Pinelis, V.G. (2017). Disruption of Functional Activity of Mitochondria during MTT Assay of Viability of Cultured Neurons. *Biochem.* 82, 737–749.

### Legendas das figuras

**Figura 1:** Desenho experimental do protocolo 01. Após injeção de streptozotocina (STZ), os animais receberam sacarose 10% na água de beber, para evitar a ocorrência de hipoglicemia, dada a destruição das células  $\beta$  do pâncreas de forma aguda e a liberação de grande quantidade de insulina. RO: reconhecimento de objetos - aquisição; T: teste; E: eutanásia.

**Figura 2:** Curva de doses de insulina. Após comprovação da hiperglicemia (dados não mostrados), os animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com as diferentes doses de insulina: 5 U/Kg (A), 10 U/Kg (B) e 20 U/Kg (C). Os animais receberam injeções de insulina subcutânea a cada 12 horas e a glicemia foi verificada no 5º, 13º e 21º dias de tratamento com insulina. As medições foram realizadas antes da injeção (zero), 2, 4 e 6 horas após o tratamento com insulina. Os animais permaneceram em jejum durante as medições. O tratamento com dose de 5 U/kg reduziu a glicemia, à níveis normais, por apenas duas horas após o tratamento e somente nos 13º e 21º dias ( $*p < 0.001$ ). A dose de 10 U/kg reduziu a glicemia por 2 horas após a injeção no 5º dia de tratamento. Após o 13º e 21º dia, a dose foi efetiva em manter a glicemia abaixo de níveis hiperglicêmicos por até 4 horas ( $*p < 0.0001$ ). Já a dose de 20 U/kg reduziu, significativamente, a glicemia no 5º dia de tratamento. No 13º e 21º dia, foi efetiva em manter os animais em normoglicemia por até 6 horas após a injeção ( $*p < 0.0001$ ). Resultados representados por média.  $n = 7$  animais/grupo.

**Figura 3:** Dosagens da glicemia e consumo de água nos grupos controle e tratados. Constatamos que todos os animais apresentaram estado hiperglicêmico três dias após a administração de STZ, visto que exibiram glicemia acima de 200 mg/dl (média: 390,9; desvio padrão: 117,15)

(A) e que a glicemia casual dos animais TI encontrava-se controlada e significativamente menor que o grupo TS e SS (\*\* $p=0,001$ ), no momento da cirurgia (C), indicando a eficiência da insulina em manter a glicemia em níveis mais baixos que os grupos tratados com salina. Observamos que a glicemia do grupo SI é estatisticamente menor que do grupo TS ( $*p<0,01$ ). Em relação à ingestão hídrica (B), observamos que esta foi maior nos grupos que receberam STZ, confirmando a presença de polidipsia induzida após a administração da droga ( $p<0,0001$ ; área sob a curva dos dias 4 à 19). Em relação à variação do peso corporal dos animais no último (19º dia) e primeiro dia de tratamento (4º dia), observamos que todos os animais tiveram redução do peso corporal em relação ao primeiro dia de tratamento. Resultados expressos em média + SEM.  $n=10$  animais/grupo.

**Figura 4:** Curva de sobrevivência avaliando a sobrevivência dos grupos TS e TI. Observou-se maior mortalidade no grupo TS que apresenta estado hiperglicêmico e não recebe tratamento com insulina ( $p=0.037$ ).  $n=10$  animais/grupo.

**Figura 5:** Distância percorrida e velocidade média nas sessões de habituação, no 1º (A e B, respectivamente) e 2º dia (C e D, respectivamente) que antecederam o teste de RO. A distância percorrida e a velocidade média são estatisticamente diferentes entre os grupos sham e TCE em ambas as sessões, o que indica a presença de hiperlocomoção no grupo trauma, que não foi alterado com administração de insulina ( $*p<0.0001$ ). Resultados expressos em média + SEM.  $n=10$  animais/grupo.

**Figura 6:** Distância percorrida minuto a minuto na sessão de habituação ao aparato. Observamos que houve habituação dos animais ao aparato dada à redução da média da distância percorrida e pela redução da locomoção nos minutos finais do teste. Resultados expressos por média.  $n=10$  animais/grupo.

**Figura 7:** Teste de reconhecimento de objetos. Na sessão de aquisição, os animais exploraram os objetos de maneira similar, não havendo preferências na exploração dos mesmos ( $p=0,99$ ) (A). Em relação ao tempo de exploração total dos objetos na sessão treino, os resultados mostram que os animais do grupo TS gastaram mais tempo explorando os objetos, quando comparado aos animais TI ( $*p=0,009$ ) (B). Na sessão teste, todos os grupos exploraram mais o objeto novo, exceto o grupo TS, que explorou de forma similar os objetos novo e familiar (C), o que indica prejuízo na memória de reconhecimento no grupo TS. Resultados expressos em média + SEM.  $n=5$  animais/grupo.

**Figura 8:** Imunoquantificação das proteínas pIRS-1<sup>Ser 612</sup> (A) e IRS-1 (B), que não apresenta diferenças entre os grupos experimentais. No entanto, na razão pIRS-1<sup>Ser 612</sup>/IRS-1 (C) observamos um aumento, na presença de insulina, somente no grupos sham ( $p=0,016$ ), contrariando o observado no TCE. Resultados expressos em média + SEM.  $n=4$  animais/grupo.

**Figura 9:** Imunoquantificação das proteínas GSK3 $\beta$ <sup>Ser 9</sup> (A), GSK3 $\beta$  (B) e a razão GSK3 $\beta$ <sup>Ser 9</sup>/GSK3 $\beta$  (C). Não há diferenças no conteúdo das proteínas entre os grupos experimentais. Porém observamos diminuição da razão GSK3 $\beta$ <sup>Ser 9</sup>/GSK3 $\beta$  no grupo sham-hiper em relação ao controle (sham-normo,  $p=0,016$ ) e que a presença de insulina não foi capaz de promover aumento dessa razão na presença do hormônio. Resultados expressos em média + SEM.  $n=4$  animais/grupo.

**Figura 10:** Estados respiratórios mitocondriais. Dados são expressos pela % do consumo de oxigênio basal de cada amostra. Observamos que o consumo de oxigênio é menor no TCE normo, em relação ao controle (sham normo), nos estados de OXPHOS (CI) (B), máximo OXPHOS (D) e OXPHOS (CII) (E) ( $*p<0,01$ ). No estado Leak (A), há aumento do consumo de oxigênio no grupo TCE-hiper insulina comparado com o sham-hiper insulina ( $*p<0,01$ ). Já o grupo sham-hiper insulina tem diminuição no consumo de oxigênio em relação ao controle nos

estados de OXPHOS (CI + CII) e máximo OXPHOS (C e D, respectivamente) (\* $p < 0,05$ ). Resultados com média + SEM.  $n=7$  a 10 animais/grupo.

**Figura 11:** Avaliação da produção de peróxido ( $H_2O_2$ ) nos diferentes estados mitocondriais. Observamos que não há diferenças entre os grupos experimentais nos estados mitocondriais analisados. Até o momento, o  $n$  amostral varia de 1 a 3, visto que esses dados encontram-se em construção. Resultados com média + SEM.  $n= 1$  a 3 animais/grupo.

**Figura 12:** Viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico de MTT. Não houve diferenças na viabilidade celular entre os diferentes grupos experimentais, 24 horas após o TCE ( $p=0,40$ ). Resultados expressos em média + SEM.  $n=4$  animais/grupo.

FIGURA 1

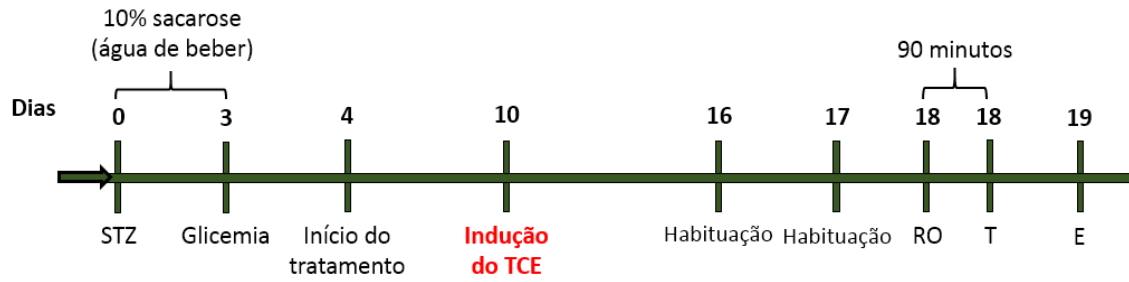


Figura 1: Desenho experimental do protocolo 01.

FIGURA 2

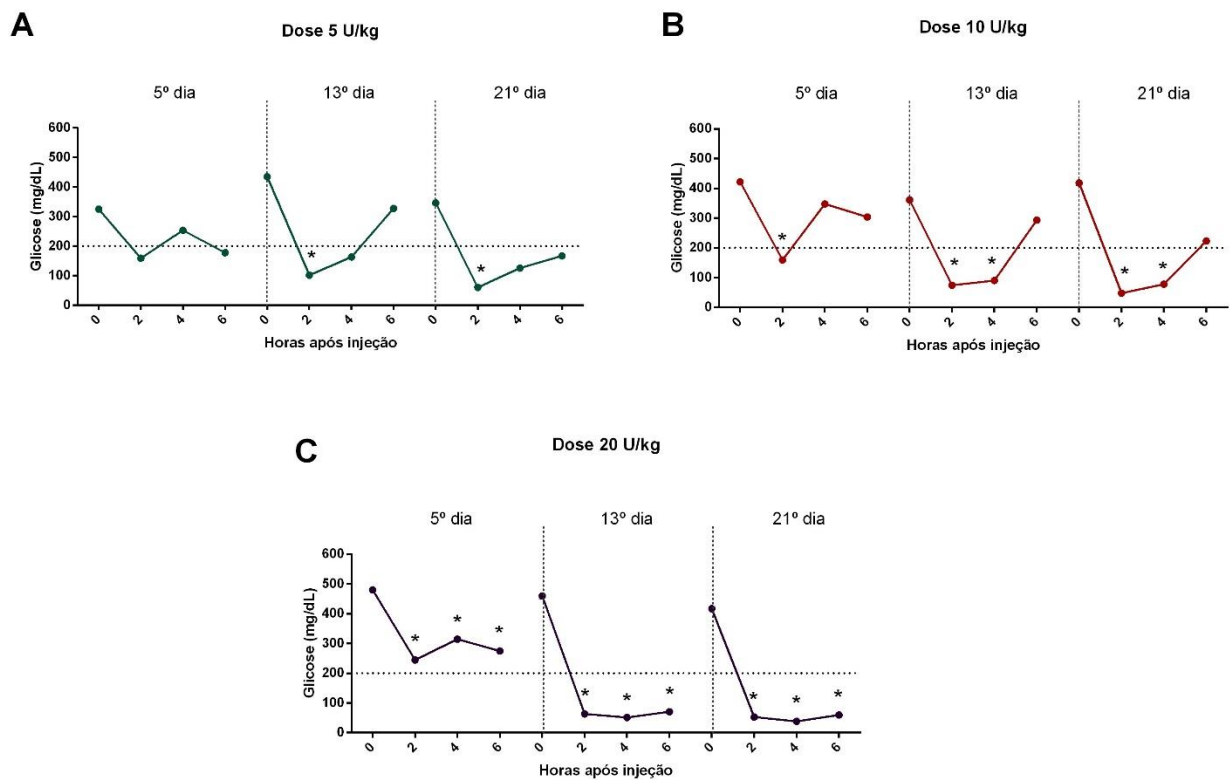


Figura 2: Curva de doses de insulina.



FIGURA 3

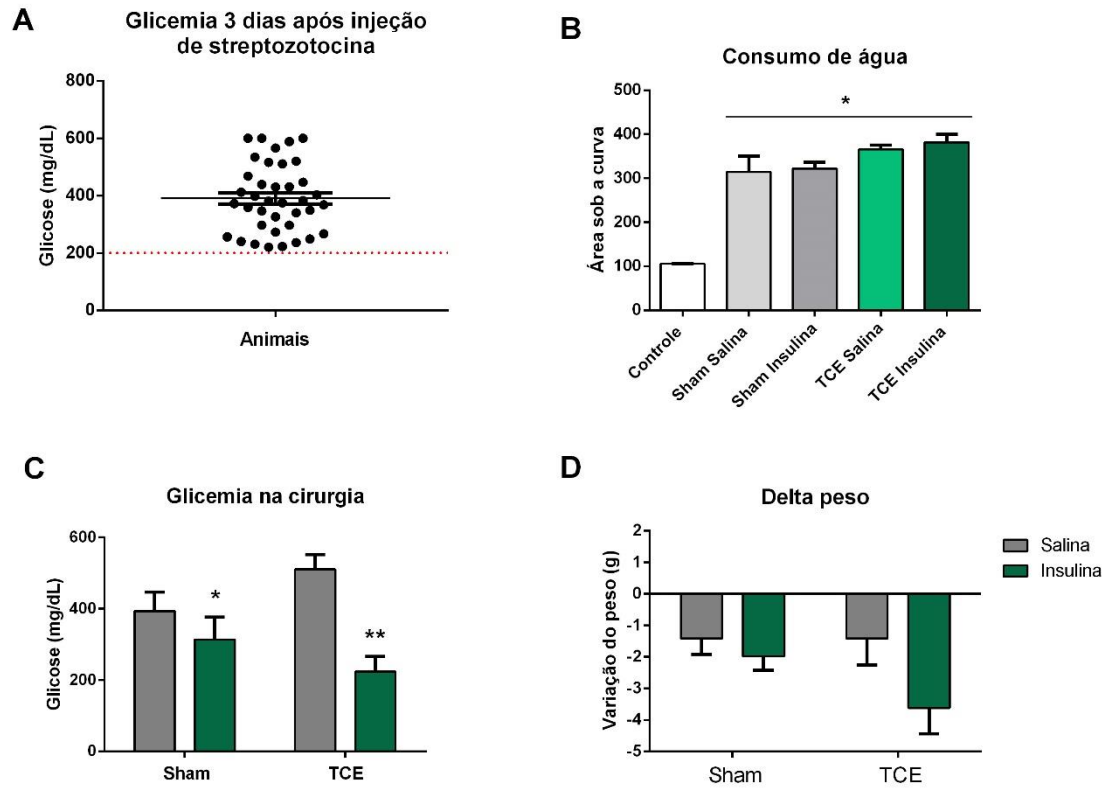
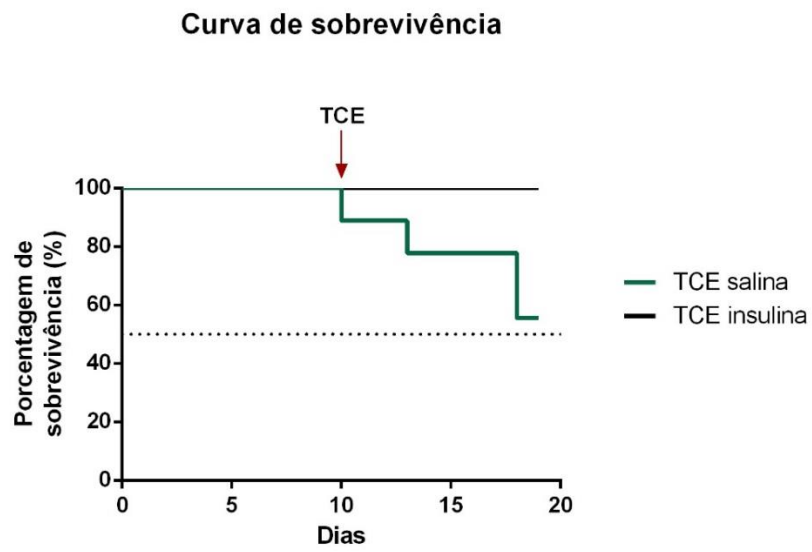


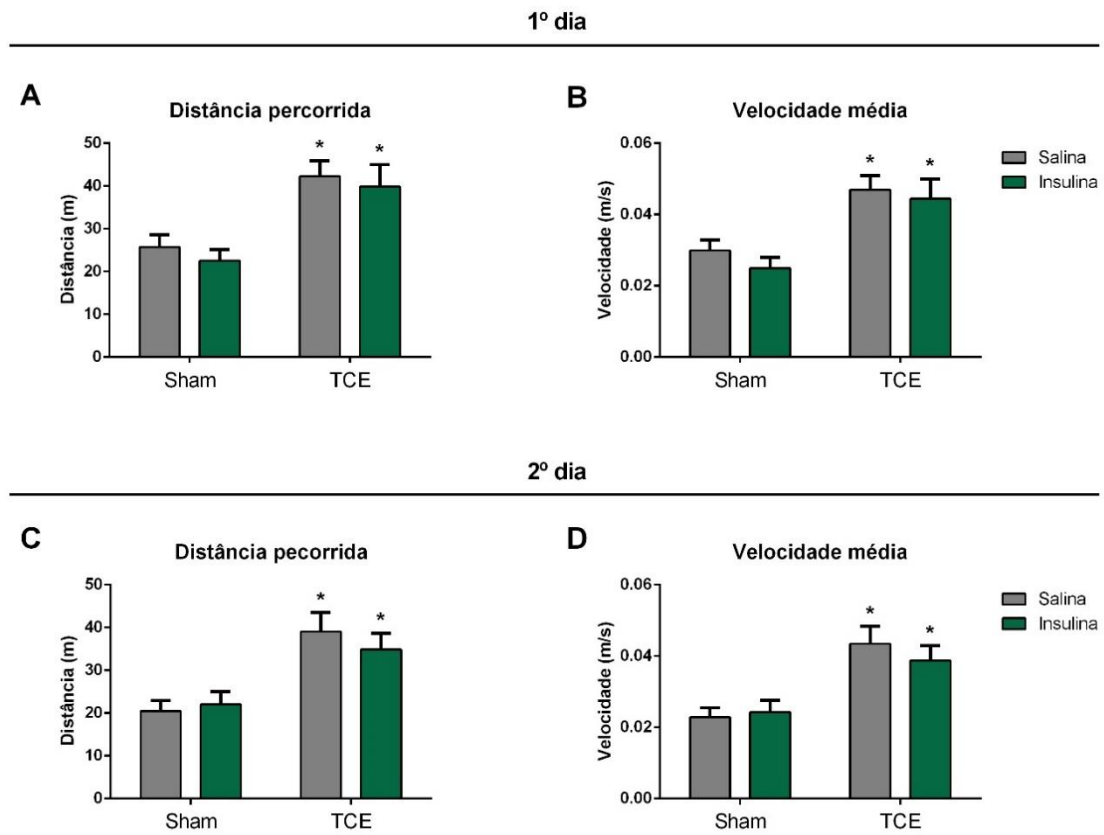
Figura 3: Dosagens da glicemia e consumo de água nos grupos controle e tratados.

FIGURA 4



**Figura 4:** Curva de sobrevivência avaliando a sobrevivência dos grupos TS e TI.

FIGURA 5



**Figura 5:** Distância percorrida e velocidade média nas sessões de habituação, no 1º (A e B, respectivamente) e 2º dia (C e D, respectivamente) que antecederam o teste de RO.

FIGURA 6

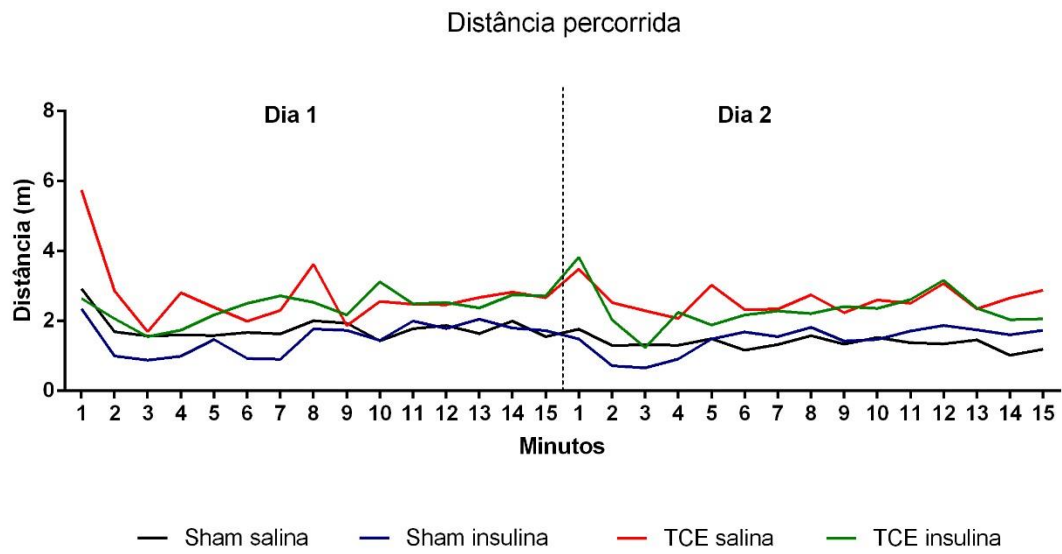
**Figura 6:** Distância percorrida minuto a minuto na sessão de habituação ao aparato.

FIGURA 7

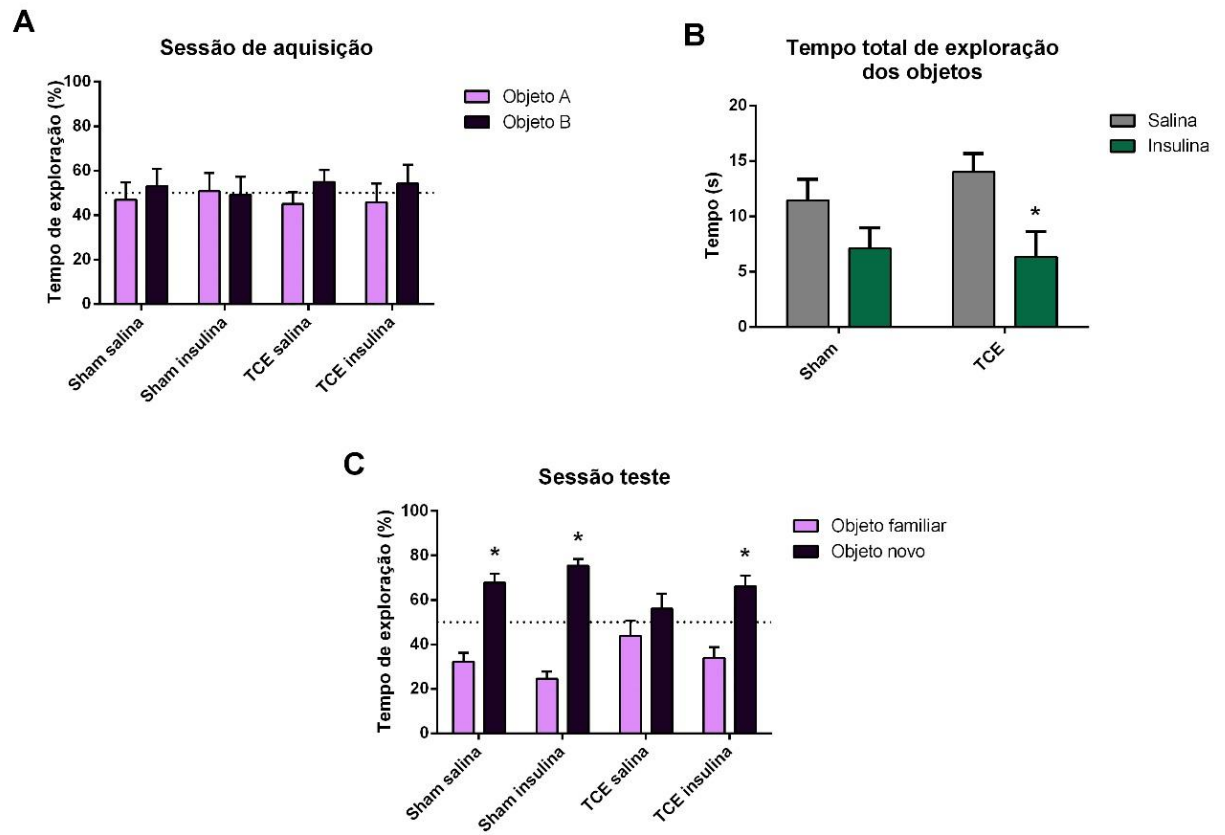
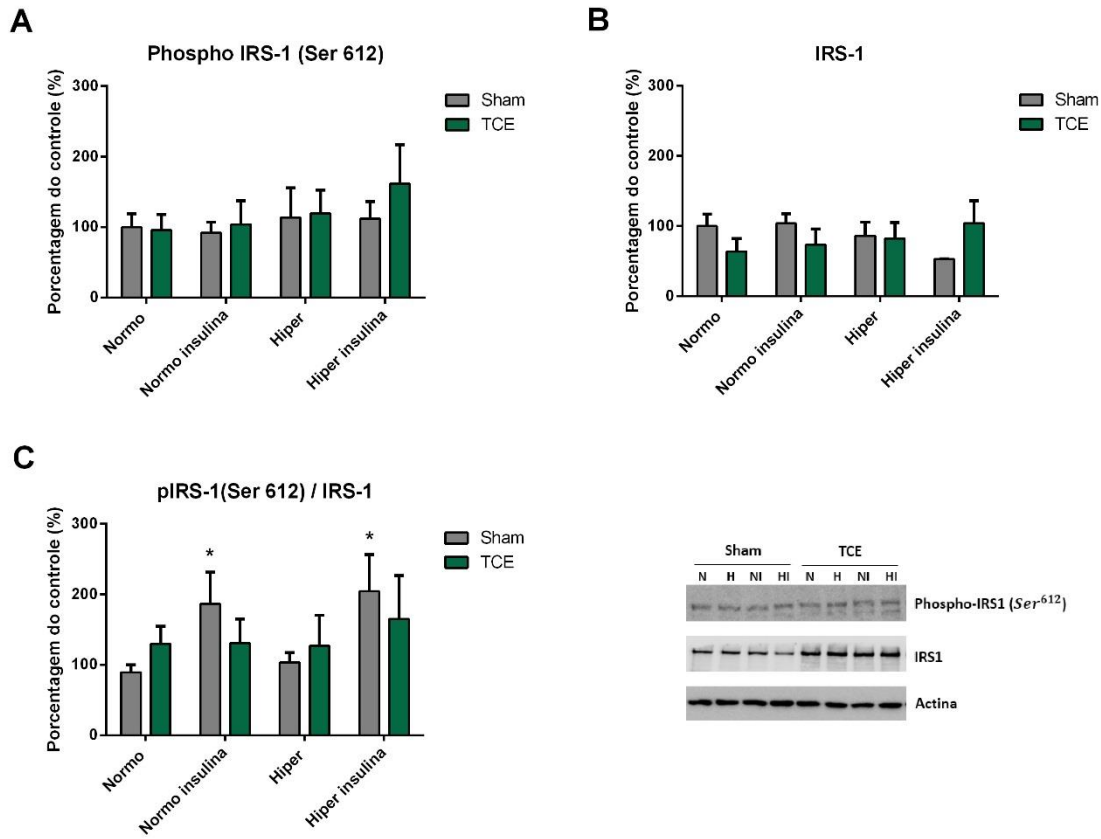


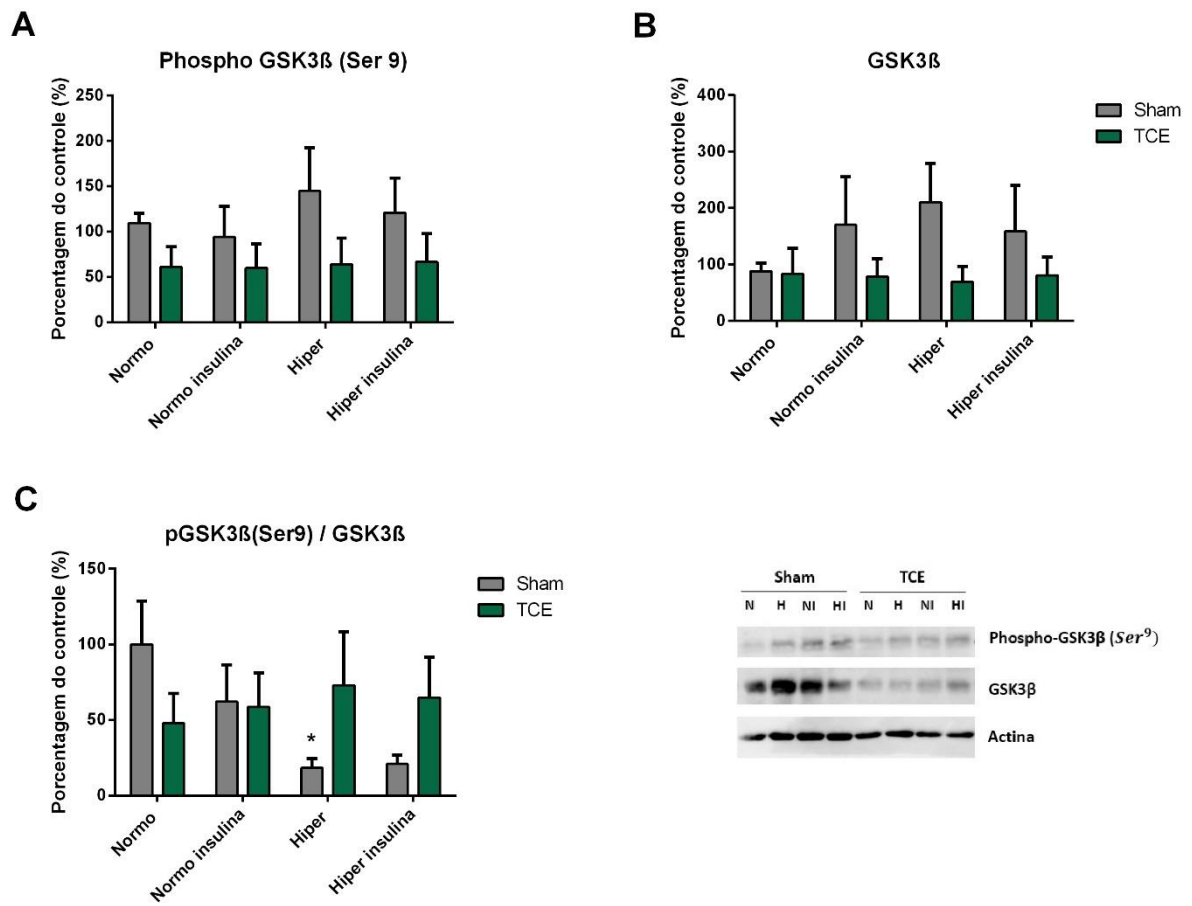
Figura 7: Teste de reconhecimento de objetos.

## FIGURA 8



**Figura 8:** Imunoquantificação das proteínas pIRS-1<sup>Ser 612</sup> (A), IRS-1 (B) e da razão pIRS-1<sup>Ser 612</sup>/IRS-1 (C).

## FIGURA 9



**Figura 9:** Imunoquantificação das proteínas GSK3 $\beta$ <sup>Ser 9</sup> (A), GSK3 $\beta$  (B) e a razão GSK3 $\beta$ <sup>Ser 9</sup>/GSK3 $\beta$  (C).

FIGURA 10

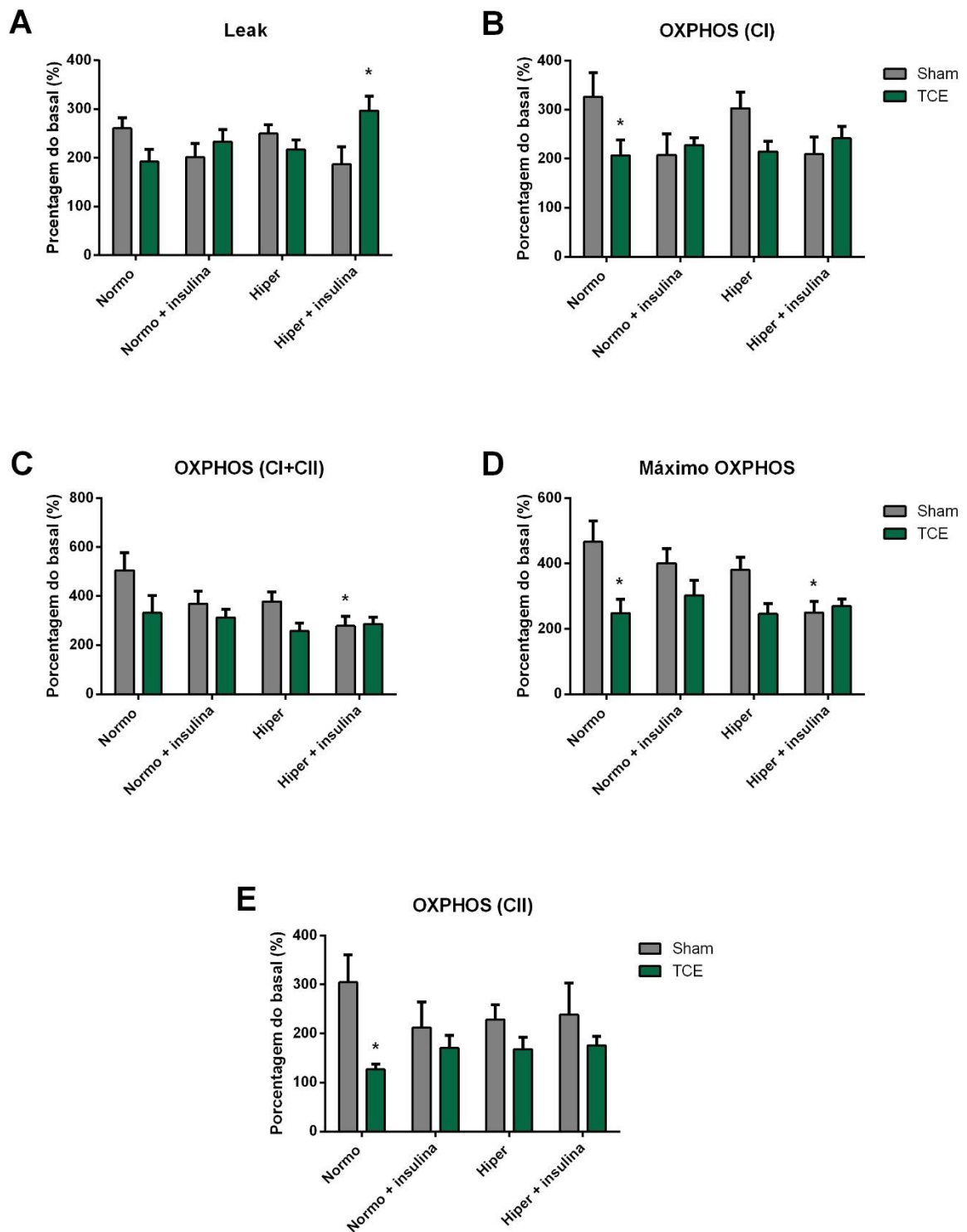
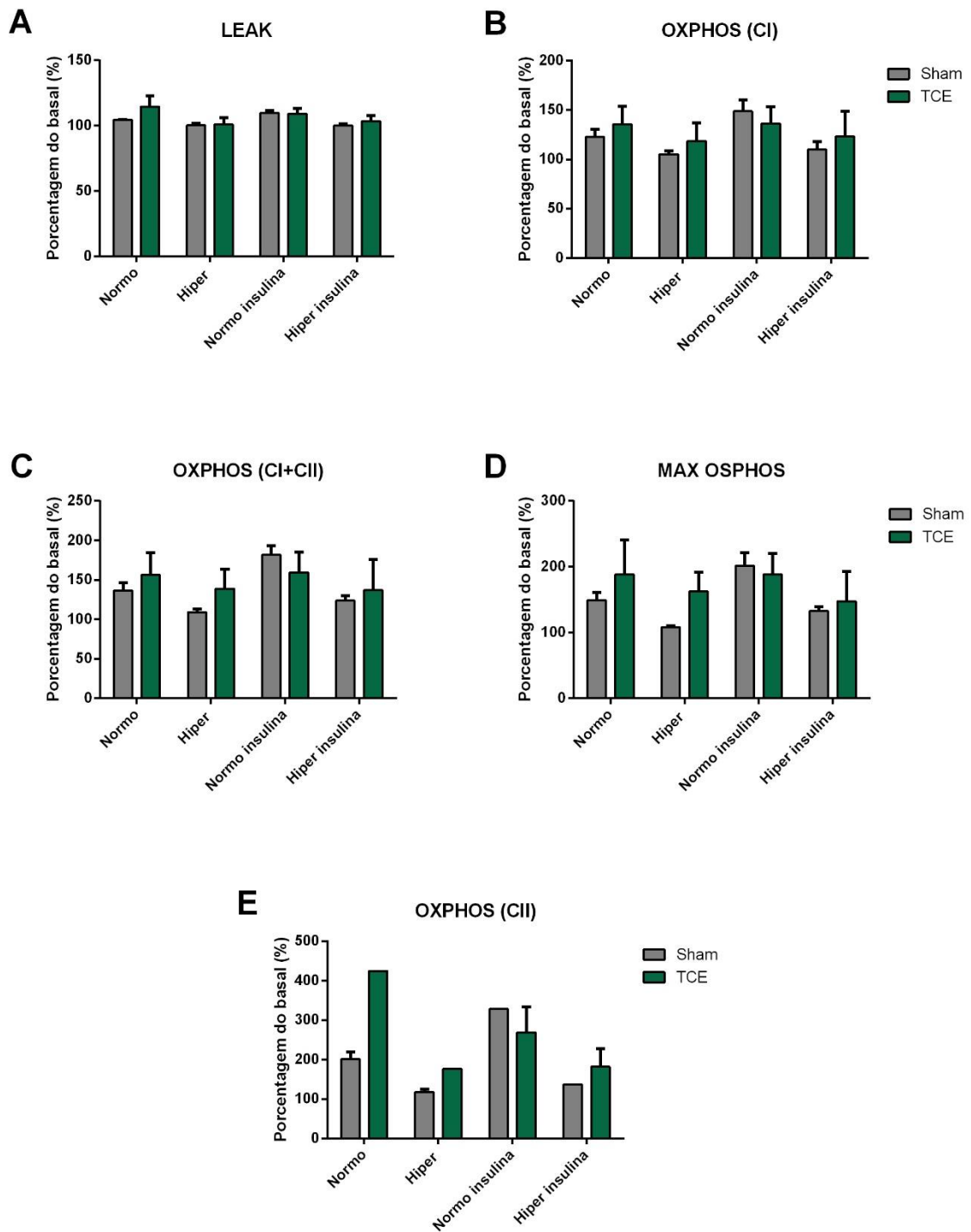


Figura 10: Estados respiratórios mitocondriais.

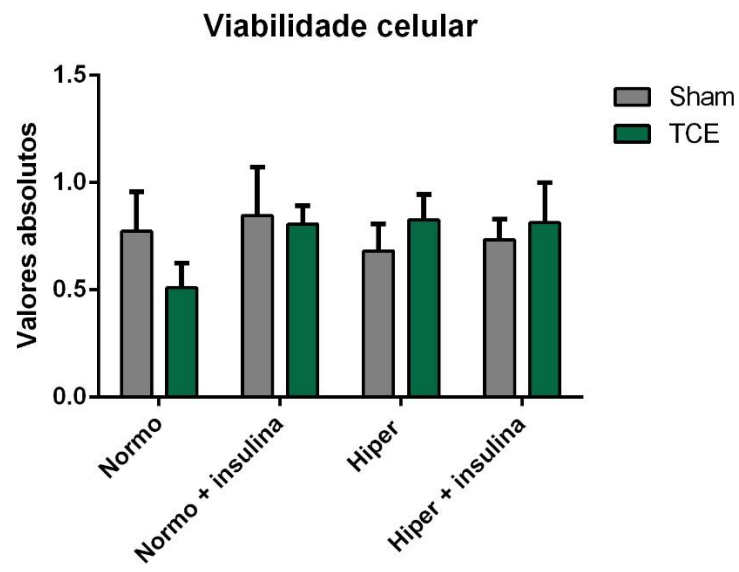


FIGURA 11



**Figura 11:** Avaliação da produção de peróxido ( $H_2O_2$ ) nos diferentes estados mitocondriais.

FIGURA 12

**Figura 12:** Viabilidade celular pelo ensaio colorimétrico de MTT.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nossos resultados evidenciam que a hiperglicemia, no TCE, promove prejuízos na memória de reconhecimento e aumento na mortalidade, dados que corroboram com a literatura clínica e experimental e são prevenidos com a administração de insulina. Agudamente, o TCE promove resistência a ação da insulina em fatias hipocâmpais e redução no consumo de oxigênio em condições saturantes de ADP, efeitos anulados na presença de insulina. Esses dados demonstram a importância da insulina na prevenção de efeitos deletérios desencadeados pelo TCE, tanto em fases agudas como em fases crônicas.

Embora nossos dados sejam preliminares, apresentam consistência e uma gama de oportunidades para investigações futuras, com algumas hipóteses já em desenvolvimento experimental. Observamos que há presença de alterações mitocondriais, em animais TCE, 24 h após o trauma e que fatias hipocâmpais, de animais sham, são responsivos a insulina, confirmando a integridade da via de sinalização do hormônio nesse grupo, contrariando o que foi observado no grupo TCE, no qual não houve ativação do feedback negativo da via.

Em suma, pretendemos explorar com mais precisão as alterações mitocondriais agudas no TCE; quais os possíveis mediadores das variações observadas e quais os efeitos, a longo prazo, essas alterações podem acarretar, na busca de identificar os mecanismos envolvidos no TCE. Almejamos, também, direcionar os estudos às proteínas da via de sinalização de insulina, buscando compreender quais as modificações pós-trauma ocorrem nessa via, identificando os efetores que desencadeiam efeitos positivos no TCE.

## REFERÊNCIAS

- ALVIS-MIRANDA, Hernando Raphael et al. Effects of Glycemic Level on Outcome of Patients with Traumatic Brain Injury: A Retrospective Cohort Study. **Bulletin of emergency and trauma**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 65–71, 2014.
- ANDRADE, Almir Ferreira De et al. Mecanismos de lesão cerebral no traumatismo crânioencefálico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 75–81, 2009.
- AZEVEDO, Jose Raimundo A. De et al. Intensive insulin therapy versus conventional glycemic control in patients with acute neurological injury: A prospective controlled trial. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 65, n. 3 B, p. 733–738, 2007.
- BANKS, William A. et al. Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier : Saturability at Euglycemic Doses of Insulin. **Peptides**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 1423–1429, 1997.
- BANKS, William A.; OWEN, Joshua B.; ERICKSON, Michelle A. Insulin in the brain: There and back again. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 82–93, 2012.
- BIESSELS, Geert Jan; REAGAN, Lawrence P. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 660–671, 2015.
- BLÁZQUEZ, Enrique et al. Insulin in the brain: Its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type 2 diabetes and alzheimer’s disease. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 5, n. 161, p. 1–21, 2014.
- BLENNOW, Kaj; HARDY, John; ZETTERBERG, Henrik. The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. **Neuron**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 886–899, 2012.
- BOSARGE, Patrick L. et al. Stress-induced hyperglycemia is associated with higher mortality in severe traumatic brain injury. **The journal of trauma and acute care surgery**, [s. l.], v. 79, n. 2, p. 289–94, 2015.
- CHENG, Gang et al. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 167, n. 4, p. 699–719, 2012.
- CHENG, Zhiyong; TSENG, Yolanda; WHITE, Morris F. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 589–598, 2010.
- DASH, Hari Hara; CHAVALI, Siddharth. Management of traumatic brain injury patients. **Korean Journal of Anesthesiology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 12–21, 2018.
- DE ALMEIDA, Carlos Eduardo Romeu et al. Traumatic Brain Injury Epidemiology in Brazil. **World Neurosurgery**, [s. l.], v. 87, p. 540–547, 2016.
- EAKINS, James. Blood glucose control in the trauma patient. **Journal of Diabetes Science**

**and Technology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 1373–1376, 2009.

FISCHER, Tara D. et al. Altered Mitochondrial Dynamics and TBI Pathophysiology. **Frontiers in Systems Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 29, p. 1–12, 2016.

FRIEDEN, Thomas R.; HOURY, Debra; BALDWIN, Grant. Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation. **Centers for Disease Control and Prevention National**, [s. l.], p. 1–74, 2015.

FU, Y. Q. et al. The impact of early hyperglycaemia on children with traumatic brain injury. **Brain Injury**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 396–400, 2017.

GARDNER, Raquel C. et al. Dementia Risk After Traumatic Brain Injury vs Nonbrain Trauma. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1490, 2014.

GAVETT, Brandon E.; STERN, Robert A.; MCKEE, Ann C. Chronic Traumatic Encephalopathy: A Potential Late Effect of Sport-Related Concussive and Subconcussive Head Trauma. **Clinical Sports Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 179–xi, 2012.

GDEK-MICHALSKA, Anna et al. Cytokines , prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems. **Pharmacological Reports**, [s. l.], v. 65, p. 1655–1662, 2013.

GHAJAR, Jamshid. Traumatic brain injury. **The Lancet**, [s. l.], v. 356, n. 9233, p. 923–929, 2000.

GIZA, Christopher C.; DIFIORI, John P. Pathophysiology of sports-related concussion: An update on basic science and translational research. **Sports Health**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 46–51, 2011.

GOLDSTEIN, Lee E. et al. Chronic Traumatic Encephalopathy in Blast-Exposed Military Veterans and a Blast Neurotrauma Mouse Model. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 134, p.134ra60, 2013.

GRAY, Sarah M.; MEIJER, Rick I.; BARRETT, Eugene J. Insulin regulates brain function, but how does it get there? **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 12, p. 3992–3997, 2014.

GUSKIEWICZ, Kevin M. et al. Association between Recurrent Concussion and Late-Life Cognitive Impairment in Retired Professional Football Players. **Neurosurgery**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 719–726, 2005.

HIEBERT, John B. et al. Traumatic Brain Injury and Mitochondrial Dysfunction. **The American Journal of the Medical Sciences**, [s. l.], v. 350, n. 2, p. 132–138, 2015.

HOPKINS, D. F. C.; WILLIAMS, G. Insulin receptors are widely distributed in human brain and bind human and porcine insulin with equal affinity. **Diabetic Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1044–1050, 1997.

HYDER, Adnan A. et al. The impact of traumatic brain injuries: A global perspective. **NeuroRehabilitation**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 341–353, 2007.

- IMPELLIZZERI, Daniela et al. Traumatic Brain Injury Leads to Development of Parkinson's Disease Related Pathology in Mice. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 458, p. 1–13, 2016.
- KARELINA, Kate et al. Traumatic brain injury and obesity induce persistent central insulin resistance. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 1034–1043, 2016.
- KERBY, Jeffrey D. et al. Stress-induced hyperglycemia, not diabetic hyperglycemia, is associated with higher mortality in trauma. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 256, n. 3, p. 446–452, 2012.
- KHAJAVIKHAN, Javaher et al. Association between Hyperglycaemia with Neurological Outcomes Following Severe Head Trauma. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 11-13, 2016.
- KOYFMAN, Leonid et al. The impact of the blood glucose levels of non-diabetic critically ill patients on their clinical outcome. **Anesthesiology Intensive Therapy**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 1–7, 2018.
- KULBE, Jacqueline R. et al. Synaptic Mitochondria Sustain More Damage than Non-Synaptic Mitochondria after Traumatic Brain Injury and Are Protected by Cyclosporine A. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 1291–1301, 2017.
- LE ROUX, Peter. Physiological monitoring of the severe traumatic brain injury patient in the intensive care unit. **Current neurology and neuroscience reports**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 331, 2013.
- MARGOLIS, Richard U.; ALTSZULER, Norman. Insulin in the cerebrospinal fluid. **Nature**, [s. l.], v.215, p. 1375, 1967.
- MCKEE, Ann C. et al. Chronic Traumatic Encephalopathy in Athletes. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 709–735, 2009.
- MEIER, Regula et al. Differential temporal profile of lowered blood glucose levels (3.5 to 6.5 mmol/l versus 5 to 8 mmol/l) in patients with severe traumatic brain injury. **Critical Care**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 1–13, 2008.
- MELO, José Roberto Tude et al. Acute hyperglycemia is a reliable outcome predictor in children with severe traumatic brain injury. **Neurosurgery**, [s. l.], v. 152, n. 9, p. 1559–1565, 2010.
- MEZ, Jesse et al. Clinicopathological evaluation of chronic traumatic encephalopathy in players of American football. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 318, n. 4, p. 360–370, 2017.
- MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. R1–R15, 2014.
- MOREIRA, P. et al. Insulin Attenuates Diabetes-Related Mitochondrial Alterations: A

Comparative Study. **Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 299–308, 2006.

MOREIRA, Paula I. et al. Insulin protects against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 628–637, 2005.

MULLER, Alexandre Pastoris et al. Insulin prevents mitochondrial generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat brain. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 247, p. 66–72, 2013.

OKONKWO, David O.; POVLISHOCK, John T. An Intrathecal Bolus of Cyclosporin a before Injury Preserves Mitochondrial Integrity and Attenuates Axonal Disruption in Traumatic Brain Injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 443–451, 1999.

PARRA, Valentina et al. Insulin stimulates mitochondrial fusion and function in cardiomyocytes via the AktmTOR-NF $\kappa$ B-Opa-1 signaling pathway. **Diabetes**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 75–88, 2014.

PLUM, Leona; SCHUBERT, Markus; BRÜNING, Jens C. The role of insulin receptor signaling in the brain. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 59–65, 2005.

QUINN, Peter C.; THURMAN, David; WILBERGER, Jack. GUIDELINES FOR PREHOSPITAL MANAGEMENT Supported by a grant from the United States Department of Transportation. [s. l.], v.19, n. 1, p.117-174, 2000.

RUAN, Hong et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: Nuclear factor- $\kappa$ B activation by TNF- $\alpha$  is obligatory. **Diabetes**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1319–1336, 2002.

RUMALLA, Kavelin et al. Association of Parkinson ' s Disease with Hospitalization for Traumatic Brain Injury. **International Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 127, n. 4, p. 326-333, 2016.

SAADAT, Seyed Mohammad Seyed et al. Association of persistent hyperglycemia with outcome of severe traumatic brain injury in pediatric population. **Child's Nervous System**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1773–1777, 2012.

SALEHI, Fateme et al. Histologic study of the human pituitary gland in acute traumatic brain injury. **Brain Injury**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 651–656, 2007.

SCHEFF, STEPHEN W.; SULLIVAN, PATRICK G. Cyclosporin A Significantly Ameliorates Cortical Damage Following Experimental Traumatic Brain Injury in Rodents. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 783–792, 1999.

SCHULINGKAMP, R. J. et al. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 855–872, 2000.

SHERIFF, Faheem G.; HINSON, Holly E. Pathophysiology and clinical management of moderate and severe traumatic brain injury in the ICU. **Seminars in Neurology**, [s. l.], v. 35,

n. 1, p. 42–49, 2015.

SHI, Jia et al. Review: Traumatic brain injury and hyperglycemia, a potentially modifiable risk factor. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 43, 2015.

SMITH, Douglas H. Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: substrates of dementia?. **Nat Rev Neurol**. [s. l.], v. 9, n. 4, p. 211–221, 2013.

TATULIAN, Suren A. Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. **Biochemistry**, [s. l.], v. 54, n. 36, p. 5523–5532, 2015.

TEASDALE, Graham; JENNETT, Bryan. Assessment of coma and impaired consciousness. **The Lancet**, [s. l.], p. 81–84, 1974.

VINK, ROBERT et al. Mitochondrial Metabolism Following Traumatic Brain Injury in Rats. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 21–27, 1990.

WALLACE, Douglas C.; FAN, Weiwei; PROCACCIO, Vincent. Mitochondrial Energetics and Therapeutics. **Annu Rev Pathol**, [s. l.], p. 297–348, 2011.

WESTERMANN, Benedikt. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, [s. l.], v. 1817, n. 10, p. 1833–1838, 2012.

XIONG, Y. et al. Mitochondrial Dysfunction and Calcium Perturbation Induced by Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 23–34, 1997.

YOUNG, Adam M. H. et al. Glycemia Is Related to Impaired Cerebrovascular Autoregulation after Severe Pediatric Traumatic Brain Injury: A Retrospective Observational Study. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 5, n. September, p. 1–7, 2017.



## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA “JOURNAL OF NEURO-TRAUMA”

### Mary Ann Liebert, Inc. Submission Benefits Package

Your submission to *Journal of Neurotrauma* provides you with robust tools and support to ensure maximum impact and readership for your work. By submitting your manuscript, you'll receive:

- **Rapid, rigorous peer-review** and editorial attention
- **Immediate deposit to PubMed** and other indexing services upon online publication
- **Exposure to thousands of thought-leaders** in your field, maximizing readers, citations, and downloads
- **Fast Track online-ahead-of-print publication**
- **Global availability in over 170 countries**
- **Open Access publication options**

### Submitting Your Manuscript

Submitting your manuscript to *Journal of Neurotrauma* delivers a comprehensive benefits program that ensures high-quality review of your research and maximum impact for your work. *Journal of Neurotrauma* carries a manuscript submission fee\* of \$75.00 USD upon submission of each new manuscript.

Upon payment, you will be provided a Manuscript Submission Code, and will be prompted to enter this information when uploading your files to our peer-review system.

**Please note:** Securing a token does not automatically create an account in our peer-review system. If you do not already have an account, you will be asked to create one before you can begin your submission.

Submissions do not need to be completed at once. Submitting authors/agents may begin the submission process, save their work, and return to the site to complete the upload(s) at a later time. There is no limit on the number of times one can save their work and subsequently resume the submission. Doing so will not incur additional charges.

### Manuscript Revisions

Processing charges and submission codes are NOT required for revisions to previously submitted papers. To upload a **revision** of a paper, the submitting author should log in to their Author Center at <http://mc.manuscriptcentral.com/neurotrauma> and click on “**Revised Manuscripts in Draft.**” The paper will appear in this area, and the submitting author will be able to upload revised files without paying any charges or entering a submission code.

**Please be sure to follow the Instructions for Authors below on Manuscript Preparation.** Authors whose submissions do not comply with the Instructions for Authors will have their papers un-submitted so that the file(s) may be adjusted accordingly. Directions regarding the necessary corrective actions will be provided in an email to the corresponding author at the time the paper is un-submitted. The submitting author/agent will then be provided the opportunity to re-upload the corrected file(s). If a paper is un-submitted, the paper will reside in the corresponding author's "Author Center" as a draft, and the submitting author/agent will be able to make the necessary adjustments and re-upload the paper without incurring another manuscript processing charge.

*\*The manuscript submission fee is independent of editorial decision and is non-refundable.*

## **Web-Based Electronic Manuscript Submission and Peer Review**

All new manuscripts must be submitted online.

Please read the Instructions for Authors before submitting your paper online.

For technical information on using Manuscript Central, contact AuthorServices@liebertpub.com

## **Instructions for Authors**

The *Journal of Neurotrauma* publishes papers dealing with all aspects of neurotrauma. This includes the anatomy, biochemistry, biophysics, immunology, pathology, pharmacology, and physiology of brain, spinal, and nerve injury. Papers published in this journal emphasize morphological, physiological, and biochemical studies of injured neurons and glial cells, mechanisms and treatments of acute and chronic injury of the nervous system, neural and glial regeneration, transplantation, in vivo and in vitro injury models, cellular growth factors, blood flow, and metabolism of injured nervous tissues, and recovery of function. Both laboratory and clinical studies are encouraged.

The journal will consider original research papers, short communications, reviews, and letters to the editor. Case reports are not accepted by the Journal. All submissions, except letters, must be accompanied by an abstract of about 250 words and keywords (<5). Original research papers should have an Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion sections. Short communications should have no sections and 6 manuscript pages or less, two tables or two figures or one of each. Reviews are invited and will be considered.

## PAGE CHARGES

Page charges for this journal are set at \$55.00 USD per typeset page. Nonpayment of page charges may result in a delay in publication. Costs for printing images in color are a separate fee and are not included in the page charge total.

## SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Submissions to the journal will be reviewed by the editorial board. Every effort will be made to ensure a speedy review and a publication time of less than 6 months. Members of the editorial board will formulate a critique of the submitted manuscript. This critique will be sent to the author and, under special circumstances, may be published at the conclusion of the paper if the manuscript is accepted. A submitted manuscript (or any part of its essential substance) must not have been published or submitted for publication elsewhere before appearance in this journal (except abstracts in connection with scientific meetings). The journal is not responsible for lost manuscripts.

Please read all the instructions to authors before submitting.

## MANUSCRIPTS

### GENERAL INSTRUCTIONS

Full mailing information should be included if not on title page, then the following page. Corresponding author should be identified on title page. Prepare text double-spaced throughout. Leave ample margins on sides, top and bottom of the page. Please submit text in Microsoft Word. On the first page, give the full title of the paper, **full name(s) and institutional affiliation(s)** of author(s) with the highest academic degrees and institutional titles. Provide a running title (<45 characters) and a Table of Contents title (<75 characters), if the full title is longer than these limits. **We require the full mailing address and contact information** (telephone, fax, and e-mail address) for EACH author listed on your article. Please include the address (es). **Please also indicate the corresponding author.** Supply an abstract (<250 words) which presents the reasons for the study, the main findings (with specific data), the principal conclusions, and a list of key words (maximum of 5). Original research papers should contain the following sections: introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, tables, and figure legends. One subsection level is allowed. Short communications should be prepared similarly to original papers. Begin each section on a separate page.

## INSTANT ONLINE PUBLICATION

The Journal publishes all accepted papers within 72 hours of acceptance in their unedited, uncorrected format. It is important to note that the information that is published online, and in all indexing services, is pulled directly from the data that is populated into the fields in Manuscript Central – NOT from the manuscript file – when the paper is originally uploaded to the system for peer review. Consequently, any errors contained in the system will remain on our website and all indexing services, including Medline, until the next revision of the article is published. As such, it is critical that authors enter all authors' names correctly into the system at the time of submission.

The next revision will take place after the corresponding author sees page proofs, makes any necessary corrections, and returns the changes to the Publisher. Once the alterations are completed, the revised version will be published on our website, and the newly corrected information will then be released to Medline/PubMed, in addition to any other indexing services in which the Journal is included.

Please note that the typical time between acceptance of a paper and page proof distribution is approximately 4-8 weeks depending on the length and complexity of the paper.

***Journal of Neurotrauma* is updating its referencing style to the numbered reference system. All submitted manuscripts should be prepared according to this new style. Please see below for the revised instructions.**

### **New Reference Style**

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references. Number all references in the order they are cited in the text; do not alphabetize. In-text citations should be in numerical order, superscripted, not contained within parentheses or brackets, and placed **after** punctuation. All references in text should be included in the reference list, and all references in the reference list should have a corresponding citation in the main text of the manuscript.

### **Preparation of Reference Section:**

Begin the Reference section on a separate page after the Author Disclosure Statement section

Double-space entire section

Personal communications, unpublished data, or manuscripts “in preparation” or “submitted for publication” should **not** be included in the Reference section. If necessary, these should be included at the appropriate place in the body of the text. Personal communications should include the contact's first initial and last name, and the month and year of the communication.

List all authors and/or editors for each listed article.

Abbreviate journal titles in accordance with PubMed/Medline ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/))

For journal article titles, capitalize only the first letter of the title.

References to abstracts should be indicated as such, with the abstract number included, if applicable

For book citations, volume and edition numbers should be included when appropriate.

### **Sample Styles:**

Lieutaud, T., Ndiaye, A., Laumon, B., and Chiron, M. (2012). Spinal cord injuries sustained in road crashes are not on the decrease in France: a study based on epidemiological trends. *J. Neurotrauma* 29, 479-487.

Bele, S., and Brawanski, A. (2009). Biomarkers and surrogate markers, in: *Neurotrauma and Critical Care of the Brain*. J. Jallo, and C.M. Loftus (eds). Theime Publishing: New York, pps. 42-52.

## **TABLE AND ILLUSTRATIONS**

Type tables double-spaced in a separate file, number tables with Arabic numerals, and provide a legend for each table. Tabular data should not be duplicated in figures.

The top of the illustration should be indicated. A legend should be supplied for each illustration, and all legends numbered consecutively and provided (double-spaced) in a separate file. Figures should be numbered in the order cited in the text. A complete set should be submitted the manuscript. Images should not show the name of the manufacturer. Please keep in mind that the figures will be reduced, so please do not submit large figures/graphs that contain small type, as the text within the figure will not be readable after reduction. Photomicrographs should be cropped to 8cm width. Electron photomicrographs should have internal scale markers. If a figure consists of two or more parts, individual parts should have similar dimensions.

Please follow these instructions carefully when preparing figure files for uploading:

Do not include any illustrations as part of your text file.

Do not prepare any figures in Word as they are not workable and will be rejected for production.

Line illustrations must be submitted at 900 DPI.

Halftones and color photos should be submitted at a minimum of 300 DPI. (NB: 600 DPI images are more desirable for production).

PowerPoint files cannot be uploaded to Manuscript Central.

Save art as either TIFF or EPS files. Do not submit JPEG files. (JPEG files are for screen representation-quality only and will print very poorly during the printing process.) To ensure proper print quality, please submit only TIFF or EPS files.

**Color art must be saved as CYMK not RGB.** (NB: If RGB files are submitted, the files will be converted to CYMK and some color variation will occur).

Label figures and tables inside the files in addition to naming the file with the figure or table number. (I.e., When figures or table files are opened, the figure or table number should appear inside the file.)

When naming your figure files, please label them with your last name, followed by a period (.), and then list the figure number. Ex: Smith.Fig 1. Label figures and tables inside the files in addition to naming the file with the figure or table number. (I.e., when figure or table files are opened, the figure or table number should appear inside the file.)

Color illustrations can be printed in the journal with a subsidy from the author(s). Please contact the Publisher for further details.

## **IMPORTANT:**

**Please upload individual files of all manuscript material—do NOT upload a single PDF file containing all text, figure, and table files of your paper. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and the peer-review process.**

## **Disclosure Statement**

Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled “Author Disclosure Statement.” In this portion of the paper, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the paper is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at <http://www.icmje.org/index.html#conflicts> for further guidance. If no conflicts exist, the authors must state “No competing financial interests exist.”

If no conflicts exist, the authors must state “No competing financial interests exist.”

## **ABBREVIATIONS, NOMENCLATURE, AND SYMBOLS**

Consult the “Style Manual for Biologic Journals,” 4th Edition, 1978 (American Institute of Biological Sciences, 1401 Wilson Blvd, Arlington, VA 22209.) Identify medications, materials, and devices by full nonproprietary name, brand name, and the manufacturer’s name, city, state, and country. Place this information in parentheses in the text.

## **PERMISSIONS**

Materials taken from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the journal for reproduction. If clearances are required by the author’s institution, statements concerning such clearance should be provided in the manuscript.

## **ANIMAL OR HUMAN EXPERIMENTATION**

Reports of research involving human and/or animal experimental subjects should be accompanied by a statement to the Editor, indicating approval by an Institutional Animal Care and Use Committee, Institutional Review Board or equivalent.

## **PAGE PROOFS**

Page proofs are sent to the corresponding author via e-mail, so please be sure to have any e-mail filters accept e-mail from the liebertpub.com domain. Please ensure that proper e-mail addresses are given.

## **REPRINTS**

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.

## **DISCLAIMER**

The statements and opinions expressed in JOURNAL OF NEUROTRAUMA are those of the individual contributors, editors, or advertisers; they do not necessarily represent the views of the other editors or the publisher. Unless specified otherwise, the authors and publisher disclaim any responsibility or liability for such material.

## **PUBLISHER**

The Journal is published by Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 140 Huguenot Street, Floor, New Rochelle, NY 10801-5215. Telephone (914) 740-2100, Fax (914) 740-2101, e-mail: [info@liebertpub.com](mailto:info@liebertpub.com), [www.liebertpub.com](http://www.liebertpub.com)